Untersuchung über die Nucleinsäuren von Leukämieviren

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Tadashi Obara

aus Tokyo

1970

Untersuchung über die Nucleinsäuren von Leukämieviren

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Tadashi Obara

aus Tokyo

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 7. 1970

Dekan: Professor Dr. W. Rüdorff
1. Berichterstatter: Privat-Dozent Dr. H. Bauer
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG . Tübingen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1968 bis März 1970 am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. W. Schäfer danke ich für sein Interesse und die Unterstützung, die er vorliegender Arbeit gewährte. Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Bauer bin ich für die Überlassung des Themas und für vielseitige Anregungen, und Herrn Dr. D.P. Bolognesi für seine Anleitung und wertvolle Diskussion zu besonderem Dank verpflichtet. Herrn Dr. H. Gelderblom danke ich für die Partikelzählung sowie die elektronenmikroskopische Aufnahme von Virusteilchen, Herrn Dr. K.W. Mundry für die Hilfe bei der Analyse der Basenzusammensetzung. Fräulein C. Allgaier, G. Hüper, A. Seydel sowie Frau G. Moebus sei gedankt für wertvolle technische Assistenz bei der Durchführung von Versuchen.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
	A) Zur Geschichte der RNS-Tumorviren	1
	B) Eigenschaften der Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren	2
	1. Klassifizierung	2
	2. Morphologie und physikalische Eigenschaften	2
	3. Chemische Zusammensetzung	3
	4. Virusspezifische Antigene	3
	5. Wirtszellkomponenten	5
	6. RNS	5
	a) Hochmolekulare RNS	5
	b) Niedermolekulare RNS	7
	7. Vermehrungsmechanismus der HLS-Viren	8
	C) Problemstellung	10
II.	MATERIAL	12
	A) Virusstämme	12
	1. AMV	12
	2. MAV-B	12
	B) Zellen und Tierstämme	12
	C) Nährmedien	13
	D) Seren	13
	E) Chemikalien und anderes Material	14
III.	METHODEN	18
	A) Züchtung von Zellkulturen	18
	B) Radioaktive Markierung des Virus	19
	1. Markierung mit ^{32}P-Orthophosphat	19
	2. Markierung mit ^{3}H-Uridin	19
	C) Bestimmung der Radioaktivität	19

Seite

D) Konzentrierung und Reinigung des Virus 20

E) Extraktion der Virus-RNS 23

F) Fraktionierung der Ribosomen-RNS aus HE-Zellen 23

G) Fraktionierung der RNS durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation 25

1. Zentrifugationsbedingungen 25

2. Nachweis verschiedener RNS-Fraktionen 26

a) Durch UV-Messung 26
b) Durch Radioaktivitäts-Messung 26

H) Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Analyse der RNS 26

1. Herstellung des Gels 26

2. Elektrophorese der RNS 28

3. Nachweis der RNS 28

a) Durch Anfärben 28
b) Durch Messung der Radioaktivität 28

I) Analyse der Basenzusammensetzung 28

J) DNS-RNS-Hybridisierung 30

1. Gewinnung der Virus- und Ribosomen-RNS 30

2. Gewinnung der Zell-DNS 30

3. Hybridisierungsverfahren 31

a) Denaturierung der DNS und ihre Immobilisierung auf dem Nitrocellulose-Membranfilter 31
b) Inkubation der RNS mit immobilisierter DNS 32
c) RNase-Behandlung und Auswertung 32

K) RNS-RNS-Hybridisierung 33

IV. ERGEBNISSE 34

A) Nachweis der 26 und 16 S RNS in Plasma-AMV 35

B) Nachweis der RNS-Komponenten II und III in MAV-B 35

C) Bestimmung des Sedimentationsverhaltens der RNS-Komponenten II und III 39

D) Quantitative Untersuchung der 27 und 17 S RNS des Virus 46

1. Bestimmung des Mengenverhältnisses der verschiedenen RNS-Komponenten 46

2. Stöchiometrische Untersuchungen 46

Seite

E) Nachweis der Integration von 27 und 17 S RNS in das Virion 50

1. Reinigung des Virus 50

2. RNase-Behandlung des Virus vor RNS-Extraktion 51

3. Suche nach Ribosomen-ähnlichen Partikeln in der virushaltigen Ausgangsflüssigkeit 54

4. Untersuchungen nach Kurzzeit-Markierung der Virus-RNS 56

F) Untersuchungen über die Basenzusammensetzung der RNS 61

G) DNS-RNS-Hybridisierungsversuche 63

H) Untersuchungen über die mögliche Existenz eines zur 60 S RNS komplementären Minusstranges 68

V. DISKUSSION 71

VI. ZUSAMMENFASSUNG 80

LITERATURVERZEICHNIS I-XII

I. EINLEITUNG

A) Zur Geschichte der RNS-Tumorviren

Die erste maligne Tumor-Erkrankung bei Tieren, die mit einer Virusinfektion in Zusammenhang gebracht wurde, war die bereits 1908 von Ellerman und Bang beobachtete Hühner-Myeloblastose, die durch Extrakte leukämischer Zellen oder das Blut kranker Tiere auf gesunde Hühner übertragen werden konnte (38). Drei Jahre später folgte eine Mitteilung von Rous über die erfolgreiche zellfreie Übertragung eines Hühner-Sarkoms (69). Diese zwei neoplastischen Erkrankungen des Huhnes, Leukämie und Sarkom, werden nach heutigen Kenntnissen durch die Infektion von Viren verursacht, die zur Gruppe der Geflügel-RNS-Tumorviren gehören. Inzwischen wurden nicht nur weitere RNS-Tumorviren beim Huhn, sondern auch in anderen Tierspecies entdeckt, vor allem bei Maus und Katze (45,51). Aufgrund ihrer ähnlichen Morphologie, wie sie sich im Elektronenmikroskop darstellt, faßt man die RNS-Tumorviren allgemein unter dem Begriff C-Partikeln zusammen (15). Da C-Partikeln ubiquitär verbreitet zu sein scheinen und ihre onkogene Wirkung in verschiedenen Tierarten gesichert ist, nimmt man heute an, daß sie in zahlreichen Tierspecies und wahrscheinlich auch beim Menschen für die Entstehung gewisser Tumoren, vor allem Leukämien, verantwortlich sind (23). Das Interesse der Krebsforschung, vor allem der Tumor-Virologie, konzentriert sich daher in letzter Zeit immer mehr auf diese Viren.

Von den verschiedenen Systemen, die z.Z. bekannt sind, ist das der Hühner-Leukose-Sarkomatose(HLS)-Viren bisher am

besten untersucht. Die vorliegende Arbeit befaßt sich ausschließlich mit Problemen dieser Virusgruppe.

B) Eigenschaften der Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren

1. Klassifizierung

Die jahrzehntelange Unterscheidung verschiedener HLS-Virustypen, die auf deren unterschiedlicher Pathogenität basierte (13), wurde nach Einführung der Gewebekultur (53,75) von einer Systematik abgelöst, die sich auf die antigene Spezifität der Virushüll-(Ve)Antigene stützt. Danach werden vier Untergruppen A, B, C und D (10,34,46,84,85) unterschieden. Viren derselben Subgruppe haben Ve-Antigene mit ähnlicher serologischer Spezifität, die dreierlei Eigenschaften des Virus bestimmen, nämlich die Induktion neutralisierender Antikörper, den Wirtsbereich, und die Fähigkeit, mit Viren der gleichen Subgruppe zu interferieren (86). Der Wirtsbereich des Huhnes wird durch genetisch bedingte Zellrezeptoren bestimmt (27), zu denen das Ve-Antigen eine spezifische Affinität besitzt. Es gibt Hühner, die entweder gegen eine oder mehrere Subgruppen der HLS-Viren resistent oder empfänglich sind (46,84). Die Interferenz mit einem Virus der gleichen Subgruppe beruht auf einer Blockierung der entsprechenden Rezeptoren (73,85).

2. Morphologie und physikalische Eigenschaften

Die Viren bestehen aus einem inneren "Kern" und der äußeren Hülle. Das im Kern gelegene Nucleoid von 35 - 45 mu Durchmesser wird von einer inneren Membran (70 mu Ø) umgeben (40).

Die äußere doppelkonturierte Virushülle mit einem Durchmesser von 80 - 125 mu enthält knopfförmige Fortsätze (Abb. 1) (21,37).

In der analytischen Ultrazentrifuge sedimentiert das Virus mit 600 - 700 S (12,72). Die Schwimmdichte beträgt 1,15 - 1,22 g/ccm (9,25,83), wobei die Differenz in der Schwimmdichte verschiedener Viruspräparate nicht nur von der Art des Dichtegradienten abhängt, sondern auch davon, in welcher Wirtszelle das Virus produziert wurde (9) (s.w.unten).

3. Chemische Zusammensetzung

Das Virus enthält bei einem Trockengewicht von ca. $7{,}5 \times 10^{-16}$ g 2,2 % RNS, 60 % Protein und 35 % Lipide (20). Die Lipide sind wahrscheinlich ausschließlich zellspezifisch. DNS wurde nur in äußerst geringer Menge festgestellt und stellte in diesen Fällen wahrscheinlich eine Verunreinigung dar (20,26).

4. Virusspezifische Antigene

HLS-Viren enthalten nach neuesten Untersuchungen mindestens fünf verschiedene virusspezifische Antigene (11). Die Fortsätze der äußeren Membran tragen wahrscheinlich das typ- bzw. subgruppenspezifische Antigen (Ve-Antigen), das für die spezifische Adsorption an die Zelle, für die Neutralisation sowie die Interferenzreaktion verantwortlich ist und erst kürzlich in löslicher und partiell gereinigter Form isoliert werden konnte (79). Von den vier weiteren Antigenen, die in der Komplementbindungsreaktion oder in der Immunpräzipitation

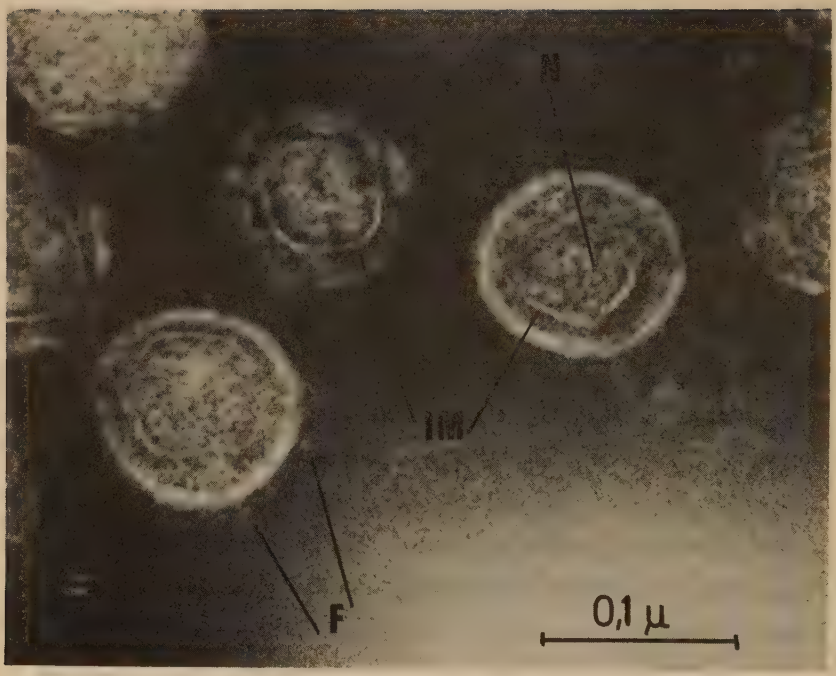


Abb. 1

Elektronenmikroskopische Darstellung von HLS-Viren.

Vor Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure wurde das Virus mit Glutaraldehyd fixiert.

F: Knopfförmige Hüllfortsätze
M: Innere Membran
N: Nucleoid

(27,31-33) erfaßt werden, stellt zumindest eines eine gruppenspezifische (gs) Innenkomponente des Virus dar (5,6).

5. Wirtszellkomponenten

HLS-Viren reifen ähnlich wie die Myxoviren in einem Knospungsprozeß an der Zellmembran (48). Beim Durchtritt durch die Membran werden je nach Art der Wirtszelle unterschiedliche Mengen zellulärer Substanzen in die Virushülle eingebaut (9). Neben den stets nachweisbaren Lipiden findet man z.B. im Myeloblastosevirus (AMV), das in Hühner-Myeloblasten gebildet wurde, ATPase und RNase. In Viren, die in Hühnerembryozellen vermehrt wurden, sind dagegen diese Enzyme nicht nachweisbar (9,29). Zelluläre RNS ist in jedem Fall vorhanden, einerlei von welcher Zellart das Virus produziert wurde. In Tabelle 1 sind die verschiedenen Zellkomponenten zusammengefaßt, die im Viruspartikel enthalten sein können.

6. RNS

Die RNS aus HLS-Viren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen isoliert, wobei einige Autoren lediglich zwei, andere dagegen vier bis fünf RNS-Komponenten mit verschiedenem Sedimentationsverhalten beschrieben.

a) Hochmolekulare RNS

Die am schnellsten im Saccharose-Gradienten sedimentierende RNS wird als die eigentliche virusspezifische RNS angesehen. Sie besitzt eine Sedimentationskonstante von 60 - 71 S, woraus man ein Molekulargewicht von ca. 1×10^7 abgeschätzt hat (7,22,50,63,64,67). Die Analyse der Basenzusammensetzung

TABELLE I

Virus-assoziierte zelluläre Komponenten

Komponente	Wirtszelle
Adenosintriphosphatase	Myeloblast
Hühner-Zell-Antigene	Erythroblast, Myeloblast, Fibroblast
Forssman Antigen	Myeloblast
Knorpel	Chondrocyt
Kollagen	Mesenchym-Zelle
Ribonuclease	Myeloblast
Lipide	Myeloblast
Ribonucleinsäure	Myeloblast

die Behandlung mit RNase, das Verhalten in verschiedenen Salzkonzentrationen bei der Zentrifugation sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß diese RNS einsträngig ist (65). Kürzlich wurde berichtet, daß sie durch Behandeln mit Dimethylsulfoxyd oder Hitze in kleinere Komponenten mit einer Sedimentationskonstanten von ~35 S übergeführt werden kann, woraus man folgerte, daß sie aus 4 - 5 Untereinheiten besteht, die durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind (33,39).

b) Niedermolekulare RNS

Von den übrigen RNS-Komponenten, deren Sedimentationskonstanten mit 26, 16, 9 und 4 - 5 S angegeben werden (22) wurde die 4 - 5 S RNS von allen Autoren, die in geringerer Menge vorkommenden 26 und 16 S RNS nur von einigen beschrieben und diskutiert (7,22,50). Die Arbeitsgruppe um Bonar deutete an, daß die 26 und 16 S RNS Ribosomen-RNS der Wirtszelle darstellen könnten, die beim Reifungsprozeß in das Virion eingebaut werden (22).

Von den niedermolekularen RNS-Komponenten ist die 4 - 5 S RNS bisher am besten untersucht. Obwohl sie von einer Arbeitsgruppe hauptsächlich als Degradationsprodukt der 60 - 70 S RNS angesehen wurde (65), konnten andere Autoren eindeutig nachweisen, daß sie zum großen Teil aus zellulärer RNS besteht (7,22) und Transfer-RNS darstellt (22,24,80).

7. Vermehrungsmechanismus der HLS-Viren

Nach Kontakt des Virus mit der Zelle erfolgt zunächst eine relativ unspezifische Adsorption des Virus an die äußere Zellwand (28,62,73). Erst für den weiteren Verlauf der Infektion, nämlich die Penetration oder das "Uncoating", scheint ein spezifischer Rezeptor notwendig zu sein (74). Etwa 1 Stunde nach Infektion sind 95 % der infektiösen Teilchen in die Eclipsephase eingetreten, und 16 Stunden später werden die ersten neusynthetisierten Virusteilchen durch die Zellwand ausgeschleust (76,82).

Die Syntheseorte für die einzelnen Viruskomponenten sind bisher nicht sicher bekannt. Während das Ve-Antigen immunfluoreszenzoptisch lediglich im Cytoplasma nachgewiesen werden konnte (82), wurde in einer bisher unbestätigten Untersuchung berichtet, daß in einer frühen Phase der Infektion das gs-Antigen außer im Plasma auch im Kern nachweisbar sei (61).

Nach der kürzlich gelungenen Isolierung eines zur Virus-RNS komplementären Minusstrangs aus den Zellkernen von Mäuse-Leukämie-Virus infizierten Zellen (17) könnte man in Analogie dazu vermuten, daß auch bei HLS-Viren die Vermehrung der RNS im Zellkern vonstatten geht. Bisher liegen allerdings hierfür keinerlei experimentelle Hinweise vor.

Auffallend für RNS-Viren sind die Befunde, wonach für die Infektion bzw. Vermehrung der HLS-Viren DNS-Synthese bzw. funktionsfähige DNS erforderlich ist. Dies wurde in Versuchen mit Antagonisten gezeigt, die entweder, wie Cytosinarabinosid oder Iododeoxyuridin, die DNS-Synthese, oder aber, wie

Actinomycin, die DNS-abhängige RNS-Synthese hemmen (2,3,77, 81). Nach einer hypothetischen Erklärung dieser Befunde soll zunächst eine zur Virus-RNS komplementäre DNS synthetisiert werden, die dann als Matrize für die Synthese von Virus-RNS dient (78). Durch Hybridisierungsversuche mit Virus-RNS und DNS aus infizierten Zellen konnte diese Hypothese allerdings nicht bestätigt werden (47,70,90,93). Auch ist bisher eine RNS-abhängige DNS-Polymerase in tierischen Zellen nicht bekannt.

Andererseits ist die Information über die Art der RNS-Replikation, im Gegensatz zu den meisten RNS-haltigen Viren (49), bei HLS-Viren recht spärlich. Bisher konnte weder eine zur Virus-RNS komplementäre sog. Minusstrang-RNS aus infizierten Zellen isoliert werden (Bauer, Bolognesi, pers. Mitteilung), noch ist die Isolierung einer Polymerase gelungen, die einen solchen komplementären Minusstrang bzw. einen RNS-Doppelstrang an der Virus-RNS als Matrize synthetisiert (91). Ein kürzlich von Watson und Beaudreau aus Myeloblastenzellen isoliertes Enzym bedarf der weiteren Untersuchung, da es offenbar überwiegend nur zwei Nucleotide als Bausteine verwendet (88).

Abgesehen von der derzeitigen Unkenntnis über die Replikation der Virus-RNS wissen wir nicht einmal Genaues über die wirkliche Größe des Virusgenoms. Während man anfänglich annahm, daß die mit 60 - 70 S sedimentierende RNS das Virusgenom darstellt, folgerte Duesberg aus seinen Degradierungsexperimenten, daß ein 35 S Molekül bereits die gesamte genetische Information eines Hühnertumorvirus enthält (33). Diese Frage könnte entschieden werden, wenn es gelänge, mit einer dieser

RNS eine Infektion auszulösen. Ein entsprechender Nachweis ist aber bisher nicht erbracht worden (7), obwohl man die gleichen Techniken verwendete, mit denen sich die Infektiosität der RNS von anderen Viren, z.B. Poliovirus, darstellen läßt.

C) Problemstellung

In Zusammenhang mit der RNS von HLS-Viren sind zwei entscheidende Fragen bisher unbeantwortet:

1. Warum ist die 60 S RNS nicht infektiös?
2. Welches ist der Vermehrungsmechanismus der RNS?

Bei den bisherigen Versuchen, diese Fragen zu beantworten, ging man immer von der Voraussetzung aus, daß die 60 S RNS die gesamte für die Virusvermehrung notwendige genetische Information enthält. Die im Virus enthaltenen niedermolekularen RNS-Moleküle wurden dabei völlig vernachlässigt. Von anderen Viren ist aber bekannt, daß das Genom in mehreren Teilstücken im Virion vorliegt (66,87); man könnte deshalb hier daran denken, daß die niedermolekularen RNS-Moleküle Teilstücke des Virusgenoms oder aber notwendige Komplementärstücke zur 60 S RNS darstellen. Die andere Möglichkeit, daß sie nämlich ausschließlich oder überwiegend RNS zellulären Ursprungs sind, wie von Bauer und Bonar et al. mit guten Gründen vermutet (7,22), würde ebenfalls eine Beteiligung beim Infektionsprozeß nicht ausschließen. Schließlich gibt es Autoren, die diskutieren, daß diese beiden RNS-Komponenten aus Verunreinigungen der Viruspräparate mit Zellbestandteilen herrühren.

Das Ziel vorliegender Arbeit war, die in HLS-Viren nachweisbaren 26 S und 16 S RNS im Hinblick auf diese Fragestellungen näher zu untersuchen und zu charakterisieren. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob diese RNS-Komponenten eventuell nur im AMV, das in Blutzellen gebildet und besonders reich an zellulären Komponenten ist, enthalten sind, oder auch in Leukoseviren, die in Kulturen embryonaler Hühnerzellen vermehrt wurden und weniger Zellkomponenten enthalten. Bei sämtlichen Versuchen wurde besonders darauf geachtet, mit hochgereinigtem, d.h. von Zelldetritus freien Viruspräparaten zu arbeiten.

II. MATERIAL

A) Virusstämme

1. AMV

Der BAI-A Stamm (Bureau of animal industry strain A) des AMV (avian myeloblastosis virus) wurde von J.W. Beard, Durham, USA, erhalten und seither in unserem Institut mehrmals im Huhn passagiert. Neben dem eigentlichen Myeloblastosevirus enthält der BAI-A Stamm Myeloblastose-assoziierte Viren (MAV), die vorwiegend zur Untergruppe A oder B gehören (57).

2. MAV-B

Nach Endpunkttitration von AMV in Zellkulturen, die gegen Viren der Gruppe A genetisch resistent waren (C/A), wurde ein Virus selektioniert, das zur Subgruppe B gehört und als MAV-B bezeichnet wurde (10). Um eine Labor-Kontamination mit einem Virus der Untergruppe A zu vermeiden, wurde das MAV-B-Virus ausschließlich in C/A-Zellen vermehrt.

B) Zellen und Tierstämme

Zum Anlegen von Zellkulturen wurden Embryonen zweier Hühnerherden verwendet. Die Linie 15 (L-15) wird seit 1965 in unserem Institut gezüchtet. Sie stammt von Dr. B.R. Burmester, East Lansing, USA, Diese Hühner lieferten Embryonen der Typen C/A und C/O.

Die zweite Herde, Spafas, stammt von Dr. R. Luginbuhl, Storrs, Connecticut, USA, und wird von der Firma Lohmann, Cuxhaven, gehalten. Der Zelltyp dieser Herde ist überwiegend C/O, selten C/B.

Beide Hühnerherden können aufgrund jahrelanger Untersuchungen als frei von Leukoseviren angesehen werden (Bauer, persönliche Mitteilung). Für die Passage und Produktion von AMV sowie die Gewinnung von Myeloblasten wurden Eintagsküken der Shaver-Linie verwendet, die wir von einer kommerziellen Farm erhielten.

C) Nährmedien

1. Für die normale Hühnerfibroblastenkultur und Markierung mit ^{3}H-Uridin wurde ein modifiziertes Medium nach Eagle (36) mit Kälberserumzusatz verwendet. Es hat folgende grundlegende Zusammensetzung:
   Aminosäuregemisch, Vitamingemisch, Glucose, Salzgemisch, Phenolrot (als pH-Indikator), Penicillin und Streptomycin.

2. Für die Markierung mit ^{32}P-Orthophosphat wurde Phosphatfreies Eagle's Medium verwendet.

D) Seren

Kälberserum wurde von der Firma Bayer AG., Leverkusen, zur Verfügung gestellt. Es wurde vor Gebrauch 30 Minuten bei 56° C inaktiviert.

E) Chemikalien und anderes Material

1. Radioaktives Material - ^{32}P-Orthophosphat und ^{3}H-Uridin - wurden über die Firma Buchler & Co., Frankfurt/M., bezogen.

2. Die für die Pufferlösung verwendeten Chemikalien, wie Trishydroxyaminomethan-HCl, Natriumchlorid, Magnesiumchlorid, EDTA u.a.
   stammten von der Firma Merck AG., Darmstadt.

3. Für die Gel-Elektrophorese wurden folgende Chemikalien verwendet:

   a) Trishydroxyaminomethan-HCl, Natriumacetat, Essigsäure, Piperidin, Glycerol:
      Firma E. Merck AG., Darmstadt.

   b) Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid (Bisacrylamid), Äthylendiacrylat, Tetramethyläthylendiamin (TEMED) Ammoniumpersulfat:
      Firma Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.
      Acrylamid und Bisacrylamid wurden in $CHCl_3$ 2x umkristallisiert.

   c) Agarose:
      l'Industrie Biologique Francaise SA, Grennevilliers, Seine, Frankreich.

4. Chemikalien und Material für Hochspannungselektrophorese:

   a) Elektrophoresepapier MN 218 (58 x 19 cm):
      Macherey-Nagel & Co., Düren.

   b) Autoradiogrammfilm (Royal Blue Medical X-ray-Film):
      Kodak AG., Rochester, New York, USA.

c) Rodinal-Negativ-Entwickler:

Agfa-Gewaert.

d) Parafilm M:

American Company, Wisconsin, USA.

e) Ammoniumacetat, Formamid, Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$) und Natriumsulfit ($Na_2O_2S_5$):

Riedel de Haen, Seelze-Hannover.

5. Enzyme:

a) RNase: Ribonuklease A aus Rinder-Pankreas (Protease-frei):

Sigma Chemical Corp., St. Louis, USA.

b) Pronase:

Calbiochem, Los Angeles, California, USA.

c) Trypsin:

Nutritional Biochemicals, Cleveland, Ohio, USA.

6. Detergentien:

a) Natriumdesoxycholat (DOC):

Merck AG., Darmstadt.

b) Natriumdodecylsulfat (SDS):

Schuchardt, München.

SDS wurde vor Gebrauch mehrmals in Äthanol umkristallisiert.

7. M-15 Nitrosecellulose-Membran-Filter:

Sartorius Membranfiltergesellschaft, Göttingen.

8. Lösungen und Puffer:

a) Puffer-gesättigte Phenol-Lösung.

Phenol (Merck AG., Darmstadt) wurde zunächst mit Zn unter Rückfluß gekocht, dann frisch destilliert und mit TSE-Puffer (s. unten) gesättigt; 8-Hydroxychinolin (Schuchardt, München) wurde bis zur Endkonzentration von 0,1 % zugegeben. Die Aufbewahrung der Phenol-Lösung erfolgte bei 20° C.

b) Saccharose-Lösung (50, 35, 20 und 5 %ige Lösung):

RNase-freie Saccharose (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) wurde in TSE-Puffer gelöst.

c) TSE-Puffer: 0,01 M Tris, 0,01 M NaCl, 0,001 M EDTA, pH 7,2.

d) TMK-Puffer: 0,05 M Tris, 0,0025 M $MgCl_2$, 0,025 M KCl, pH 7,2.

e) Elektrophoresepuffer für Gel-Elektrophorese:

Eine 10fach konzentrierte Stammlösung (10 x E-Puffer) enthielt 0,4 M Tris, 0,2 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA in 1 Liter dest. H_2O, pH 7,2.

f) Acetatpuffer: 0,4 M Natriumacetat, pH 4,2.

g) Ammoniumacetatpuffer für Hochspannungselektrophorese:

20 % Ammoniumacetat, 8 % Formamid, pH 3,0.

h) Salz-EDTA-Lösung: 0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA, pH 8,0.

i) SSC-Puffer: 0,15 M NaCl, 0,015 M Trinatriumcitrat, pH 7,2. 10 x SSC, 6 x SSC, 2 x SSC und 1/100 x SSC sind dementsprechend konzentrierte bzw. verdünnte Puffer.

9. Scintillator-Flüssigkeit:

a) Toluol

1,5 g POPOP und 5 g PPO wurden auf 5 l mit Toluol aufgefüllt (POPOP: 2,2'-Phenylen-bis-(4-Methyl-5-Phenyloxazol) (PPO: 2,5-Diphenyloxazol).

b) Dioxan (Bray's Solution)

20 g PPO, 1 g POPOP, 300 g Naphthalin, 90 ml Äthylenglykol, 720 ml Methanol wurden mit Dioxan auf 5 l aufgefüllt. PPO, POPOP, Naphthalin, Äthylenglykol, Methanol und Dioxan wurden durch die Firma Merck AG., Darmstadt, bezogen, die beiden letzteren in einem Reinheitsgrad, wie er zu synthetischen Zwecken verwendet wird.

III. METHODEN

A) Züchtung von Zellkulturen

Hühnerembryo(HE)-Zellkulturen wurden nach einer Modifikation der Methode von Dulbecco (35) angelegt. Aus 11 Tage bei 38° C bebrüteten Hühnereiern wurde der Embryo entnommen und Kopf, Beine und Eingeweide entfernt. Der Embryorest wurde mit einer Pinzette zerkleinert und in 20 ml einer 0,25 %igen Trypsinlösung bei 20° C für 20 Minuten inkubiert. Nach anschließender Entfernung der groben Gewebeteilchen mittels Filtration durch Gaze wurden die durch das Trypsin aus dem Gewebe herausgelösten Einzelzellen 5 Minuten bei 2000 UpM abzentrifugiert, in einer Konzentration von 6 - 8 x 10^6 Zellen/ml Nährmedium in Petrischalen mit 8,6 cm Durchmesser ausgesät und bei 38° C in einem Luft-CO_2-Gemisch inkubiert.

Nach 4 - 7 Tagen wurden Sekundärkulturen angelegt. Hierzu wurde das Medium von der Kultur abgesaugt und die Zellen mit einer 0,05 %igen Trypsinlösung bei 38° C 10 Minuten inkubiert. Die so herausgelösten Zellen wurden durch Zentrifugation von Trypsin freigewaschen und in einer Konzentration von 2 - 2,5 x 10^6 Zellen/Petrischale ausgesät.

Das Eagle's Medium enthielt für Primärkulturen 8 % und für weitere Zellpassagen 4 % Kälberserum.

B) Radioaktive Markierung des Virus

1. Markierung mit ^{32}P-Orthophosphat

Die mit MAV-B infizierten HE-Zellkulturen wurden mehrmals mit phosphatfreiem Eagle's Medium gewaschen. Danach wurden sie mit 10 - 100 uC/ml ^{32}P-Orthophosphat in phosphatfreiem Eagle's Medium mit 10 % Kälberserum, das durch Dialyse ebenfalls Phosphat-frei gemacht worden war, bei 37° C inkubiert. Die Inkubationsdauer war je nach Versuch verschieden.

2. Markierung mit ^{3}H-Uridin

Im Prinzip gleicht das Verfahren dem oben beschriebenen. Für ^{3}H-Uridin (10 uC/ml) wurden die Kulturen mit normalem Eagle's Medium vorgewaschen, bevor sie mit dem entsprechenden Isotopen-haltigen Medium und einem Zusatz von 10 % Kälberserum inkubiert wurden.

C) Bestimmung der Radioaktivität

Radioaktives Material wurde entweder direkt in Dioxan-Scintillationsflüssigkeit aufgenommen oder durch Zugabe von 10 % Trichloressigsäure auf Membranfilter gefällt, die nach Trocknen bei 80° C in Toluol-Scintillationsflüssigkeit gegeben wurden. Als Flüssigkeitsbehälter wurden in der Regel Plastik-Röhrchen der Firma Hormuth, Heidelberg, benützt, die für einmaligen Gebrauch bestimmt sind. Die in der Scintillationsflüssigkeit enthaltene Radioaktivität wurde im Tricarb-Flüssigkeits-Scintillationszähler der Firma Packard Instrument, La Grange, Illinois, USA, gemessen.

D) Konzentrierung und Reinigung des Virus

Die Virusreinigung wurde nach einer von Bauer beschriebenen Methode durchgeführt (12). Vor der Konzentrierung von Virus aus Nährmedium oder Hühnerplasma wurde zunächst der Zelldetritus durch niedertourige Zentrifugierung (10 Minuten 3000 UpM) entfernt. Sodann wurde das Virus durch 60 Minuten lange Ultrazentrifugierung bei einem Performance Index von 10 (41) abgeschleudert. Das Virussediment wurde in einem kleinen Volumen einer 5 %igen Saccharose-Lösung aufgenommen, auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (je 1,5 ml 50 %, 35 % und 20 % Saccharose in Tris-Puffer) aufgelegt und bei 30 000 UpM und 15° C 30 Minuten zentrifugiert. Radioaktiv-markiertes Virus wurde zur Entfernung löslicher radioaktiver Substanzen vorher gegen Phosphatpuffer dialysiert und danach durch Ultrazentrifugierung wieder konzentriert.

Bei ausreichender Viruskonzentration kann man drei Banden im Gradienten erkennen, von denen die mittlere Bande gereinigtes Virus enthält, die obere offenbar aus kleineren Bestandteilen bzw. solchen mit geringer Dichte und die untere aus Zelldetritus und geringeren Mengen von Virusaggregaten besteht (Abb. 2).

Wenn die vorhandene Virusmenge keine sichtbare Virusbande bildete, wurde das Zentrifugenröhrchen am Boden mit einer Nadel punktiert und sein Inhalt fraktioniert. Die Virusbande wurde dann durch Bestimmung der Radioaktivität jeder einzelnen Fraktion im Flüssigkeits-Scintillationszähler bestimmt (Abb. 3).

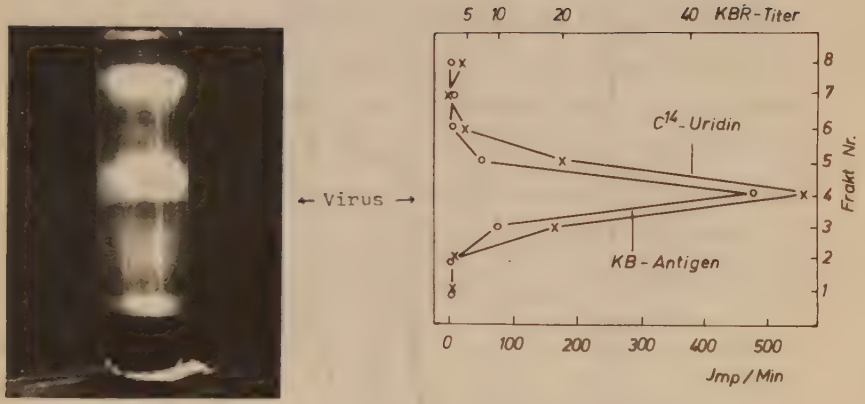


Abb. 2

Reinigung von AMV durch Ultrazentrifugation im Saccharose-Gradienten.

Das in der mittleren Bande enthaltene Virus wurde durch Komplementbindungsreaktion mittels virusspezifischer Antiseren bzw. durch Bestimmung des in die Virus-RNS eingebauten ^{14}C-Uridins identifiziert (12).

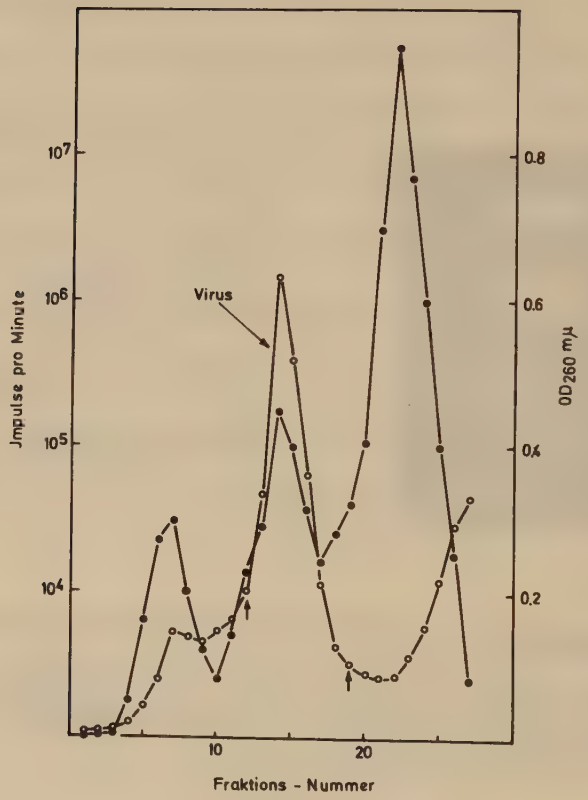


Abb. 3

Reinigung von MAV-B durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation.

o——o Radioaktivität (^{32}P)
●——● UV-Absorption

E) Extraktion der Virus-RNS

Nach Isolierung der Virusbande aus dem Saccharose-Gradienten wurde die Saccharose durch Zugabe von TSE-Puffer soweit ausverdünnt, daß sie bei der folgenden Phenol-Extraktion nicht störte. Das Virus wurde zunächst mit 0,5 % SDS gespalten und die RNS anschließend durch zweimalige Phenol-Behandlung bei pH 7,0 und 4° C extrahiert (42). Nach dieser Prozedur wurden die Phasen durch Zentrifugierung (800 x g, 5 Minuten) getrennt, die wässrige Phase isoliert und zur Entfernung des Phenols mit Äther gewaschen. Die RNS wurde durch Zugabe von 2 Volumen Äthanol und 1/10 Volumen von 20 %iger CH_3COOK-Lösung (pH 5,2) aus der wässrigen Phase präzipitiert und bei -20° C aufbewahrt.

F) Fraktionierung der Ribosomen-RNS aus HE-Zellen

Die Ribosomen-RNS wurde nach der Methode von Blobel und Potter (18) in folgender Weise gewonnen:

HE-Zellen wurden mit 0,05 %igem Trypsin bei 37° C 15 Minuten behandelt, danach mit TMK-Puffer mehrmals gewaschen und in ca. 10fachem Zellvolumen des TMK-Puffers 10 Minuten bei 4° C stehen gelassen, bevor sie durch Zentrifugierung (800 x g 5 Minuten) sedimentiert wurden. Das Zellsediment wurde in gleichem Volumen einer 0,25 M Saccharose-TMK-Lösung suspendiert und die Zellen nach dem in Abb. 4 dargestellten Schema fraktioniert.

Zunächst wurden sie unter Erhaltung der Kerne mit dem Dounce-Glas-Homogenisator aufgebrochen (30). Der Homogeni-

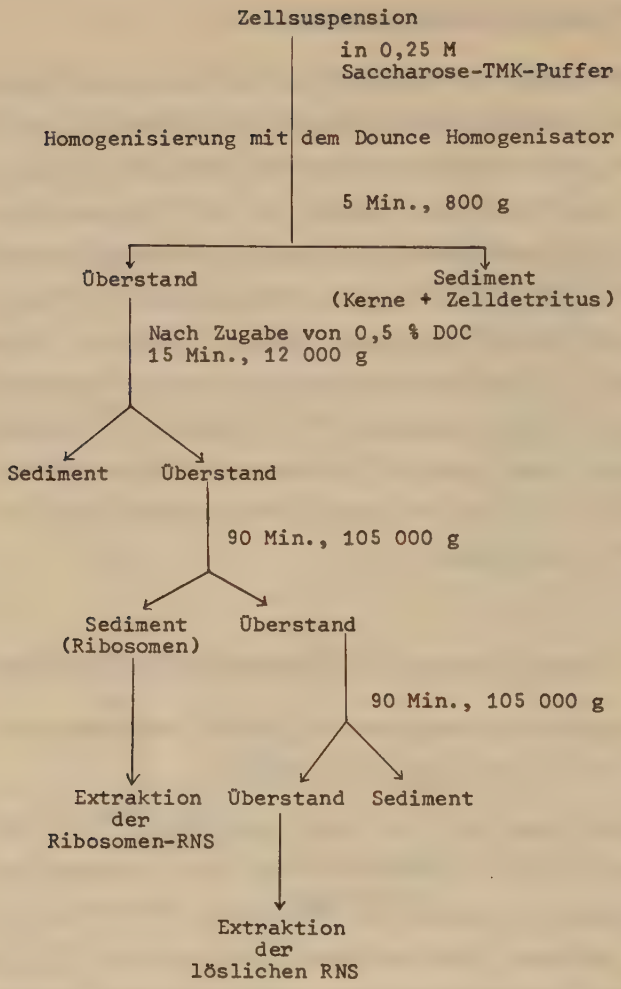


Abb. 4

Schema der Zellfraktionierung

sierungsgrad der Zellen wurde im Lichtmikroskop kontrolliert. Es wurde solange homogenisiert, bis mindestens 80 % der Zellen aufgebrochen waren. Aus dem Homogenat wurden durch 10 Minuten langes Zentrifugieren bei 800 x g Kerne und restliche Zellen entfernt. Nach Zugabe von Natriumdesoxycholat (DOC) bis zur Endkonzentration von 0,5 % wurde der Überstand 15 Minuten bei 12 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand 90 Minuten bei 105 000 x g zentrifugiert. Die unter dieser Bedingung sedimentierenden Ribosomen wurden mit einer Pasteur-Pipette in 1 - 2 ml TMK-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von SDS bis zur Endkonzentration von 1 % wurde die Ribosomen-RNS durch Behandeln mit Phenol (pH 5,2) bei Zimmertemperatur extrahiert, die wässrige Phase zur Entfernung des Phenols mit Äther gewaschen und die RNS durch Zugabe von Äthanol und 2 % CH_3COOK präzipitiert.

G) Fraktionierung der RNS durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

1. Zentrifugationsbedingungen

Die RNS wurde durch Ultrazentrifugierung (25 000 UpM, 20 Minuten) aus dem Äthanol sedimentiert, in 0,20 - 0,25 ml TSE-Puffer aufgenommen und auf einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (5 - 20 % Saccharose in TSE-Puffer) in einem Röhrchen des SW 50 Rotors der Spinco Beckman Ultrazentrifuge aufgelegt. Für die Auftrennung der gesamten Virus-RNS wurde 60 Minuten, für die genaue Auftrennung von niedermolekularer Virus- und Ribosomen-RNS 135 Minuten bei 4° C und 50 000 UpM zentrifugiert (19).

2. Nachweis verschiedener RNS-Fraktionen

a) Durch UV-Messung

Nach der Zentrifugierung wurde das Zentrifugenröhrchen am Boden mit einer Nadel punktiert, der Inhalt durch einen dünnen Schlauch durch ein kontinuierliches UV-Spektralphotometer (Zeiss Spektrophotometer PMQ II mit Durchlaufzelle) geleitet und danach die Fraktionen in Glasröhrchen aufgefangen.

b) Durch Radioaktivitäts-Messung

Für die Radioaktivitätsmessung wurde der Röhrcheninhalt durch ein Loch am Boden des Zentrifugenröhrchens in Fraktionen gleicher Tropfenzahl aufgefangen. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde der jeweils mittlere Tropfen einer Fraktion in einem Röhrchen mit Dioxan-Scintillatorflüssigkeit aufgefangen.

H) Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Analyse der RNS

1. Herstellung des Gels

Im Prinzip wurde nach der von Loening bzw. Peacock und Digman beschriebenen Methode gearbeitet (52,59).

Folgende Stammlösungen wurden verwendet:

a) 10 E-Puffer (10fach konzentrierter Elektrophorese-Puffer): 0,4 M Tris, 0,2 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA pH 7,2.

b) Acrylamid-Stammlösungen

α) mit Äthylendiacrylat

15 % Acrylamid + 0,4 % Äthylendiacrylat in H_2O

ß) mit Methylenbisacrylamid

15 % Acrylamid + 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid in H_2O

c) 2 %ige Agarose-Lösung in H_2O

d) TEMED (Tetramethyläthylendiamin) und Ammoniumpersulfat (Flüssigkeit) wurden von der Firma Serva, Heidelberg, bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Die Gel-Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

2,0	ml	Acrylamid (α) oder (ß)
1,5	ml	10 E-Puffer
3,75	ml	Agarose
0,015	ml	TEMED
0,1	ml	Ammoniumpersulfat
7,64	ml	H_2O

Die Endkonzentration des Acrylamid betrug jeweils 2,1 %, die von Agarose 0,5 %, die von Äthylendiacrylat 0,06 % und die von Bisacrylamid 0,12 %.

Acrylamid, 10 E-Puffer, Agarose, TEMED, H_2O wurden mit dem Magnetrührer gemischt und kurz vor dem Einfüllen in ein Glasröhrchen Ammoniumpersulfat zugegeben (Glasröhrchen: Innendurchmesser 0,56 cm, Außendurchmesser 0,8 cm). Das Gel wurde dann bei Zimmertemperatur etwa 30 Minuten polymerisiert. Danach wurde die Spitze des Gels mit einer Rasierklinge glatt geschnitten und eine Glaskappe daraufgesetzt. Das Gel wurde dann 1 Stunde elektrophoretisch gereinigt.

2. Elektrophorese der RNS

Die RNS-Probe wurde in 0,1 ml E-Puffer mit 5 % Glycerol aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Sie wurde dann bei 10 V/cm und 5 mA/Gel je nach Versuchszweck 60 - 110 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt.

3. Nachweis der RNS

a) Durch Anfärben

Das Gel wurde mit 1 M Essigsäure 10 Minuten fixiert und mit 0,2 %igem Methylenblau in 0,4 M Acetatpuffer (pH 4,2) angefärbt. Die überschüssige Farbe wurde durch 12 Stunden langes Wässern entfernt (59).

b) Durch Messung der Radioaktivität

Das Gel wurde mit einem scharfen Messer in gleichgroße Stücke von 1,0 - 1,5 mm Dicke zerschnitten, die in Scintillator-Röhrchen mit 0,5 ml Piperidin (0,2 M) 10 Minuten bei 100° C inkubiert wurden. Wenn die Gel-Scheiben gelöst waren, wurden 10 ml Dioxan-Scintillatorflüssigkeit zugegeben und die Radioaktivität gemessen.

I) Analyse der Basenzusammensetzung

Die Analyse der Basenzusammensetzung wurde mittels Hochspannungs-Papierelektrophorese durchgeführt (71). Die ^{32}P-markierte RNS wurde nach Präzipitierung durch Äthanol in 0,1 - 0,4 ml destilliertem Wasser gelöst und dann auf einen Parafilm aufgetragen und im Vakuum getrocknet. Die lyophili-

sierte RNS wurde dann in 50 - 60 µl von 3 M KOH gelöst und in kleinen verschlossenen Plastik-Zentrifugenröhrchen 18 Stunden bei 37° C hydrolysiert. Nach Abkühlen wurde das Hydrolysat mit 6,5 M $HClO_4$ sorgfältig neutralisiert, das dabei ausfallende $KClO_4$ abzentrifugiert und der Überstand auf das Elektrophoresepapier MN 218 (58 cm x 19 cm) aufgetragen, das vorher mit dem Elektrophoresepuffer (Ammoniumacetat-Formamid-Puffer) gesättigt worden war.

Die Nukleotide wurden dann bei 3000 V, 65 mA und 2 - 4° C für 2 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt (Hochspannungselektrophorese, Firma Hölzel-Technik, München). Danach wurde das Papier 4 Stunden an der Luft getrocknet und anschließend für die Dauer von 24 - 48 Stunden mit einem Film überzogen (Kodak, Royal Blue, Medical X-ray film). Dieser wurde dann mit Rodinal Negativ-Entwickler 10 Minuten entwickelt, mit 20 %igem Natriumthiosulfat (NaS_2O_3) und 2 %igem Natriumdisulfit ($Na_2S_2O_5$) 15 Minuten fixiert und anschließend unter fließendem Wasser 1 Stunde gewaschen. Nach dem Trocknen wurde der Film auf das Original-Elektrophresepapier gelegt, die den Flecken auf dem Autoradiogramm entsprechenden Stellen ausgeschnitten und in 5 ml Toluol-Scintillatorflüssigkeit auf ihre Radioaktivität untersucht. Nach Sebring und Salzman (71) ist die radioaktive Markierung der Nukleotide ein direktes Maß für deren Mengenverteilung.

J) DNS-RNS-Hybridisierung

1. Gewinnung der Virus- und Ribosomen-RNS

Die Extrahierung und Fraktionierung der Virus- und Ribosomen-RNS erfolgte wie vorher beschrieben, wobei erstere mit ^{32}P-Orthophosphat markiert war und zum Zweck der besseren Auftrennung zweimal unter verschiedenen Bedingungen im Saccharose-Gradienten zentrifugiert wurde (s. Ergebnisse).

2. Gewinnung der Zell-DNS

Mit MAV-B infizierte und nicht infizierte HE-Zellkulturen wurden trypsinisiert und die Zellen anschließend mit Phosphatpuffer mehrmals gewaschen. Die DNS wurde dann nach einer geringfügigen Modifikation der Methode von Marmur (54) in folgender Weise extrahiert:

Die Zellen wurden in etwa 10 ml Salz-EDTA suspendiert und mit 1 % SDS bei 37° C 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von $NaClO_4$ bis zur Endkonzentration von 1 M wurde das Zelllysat mit 10 ml Chloroform-Amylalkohol-Gemisch (10 : 1) 30 Minuten gerührt. Die entstandene Emulsion wurde dann 10 Minuten bei 800 x g zentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde isoliert und mit 10 ml Chloroform-Amylalkohol-Gemisch 30 Minuten gerührt. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 Minuten 800 x g) wurde zur wässrigen Phase 10 ml abs. Äthanol zugegeben und das entstehende DNS-Präzipitat durch langsames Rühren an einem Glasstäbchen gesammelt. Die DNS wurde dann in 10 ml 1/100 x SSC-Puffer langsam gelöst und 60 Minuten bei 37° C mit 50 ug/ml RNase

behandelt. Danach wurde das Gemisch 2 Stunden bei 37° C mit 50 ug /ml Pronase inkubiert. Hierdurch wurden die RNase und das an der DNS haftende Protein hydrolysiert, während sich Pronase unter diesen Bedingungen selbst verdaut. Die Salzkonzentration wurde dann durch Zugabe von konzentriertem SSC-Puffer auf die Konzentration des Standard-SSC-Puffers gebracht und die Lösung mit dem Chloroform-Amylalkohol-Gemisch nochmals unter der gleichen Bedingung wie vorher gerührt. Nach Zentrifugation (10 Minuten 800 x g) wurde die DNS aus der wässrigen Phase durch Zugabe von gleicher Menge abs. Äthanol präzipitiert, mit dem Glasstäbchen gesammelt und in 10 ml von 1/100 x SSC gelöst. In dieser Lösung wurde sie bis zum Gebrauch bei 4° C aufbewahrt.

3. Hybridisierungsverfahren

Die hierbei angewendete Methode beruhte hauptsächlich auf der Gillespie-Spiegelman'schen Filtertechnik (43).

a) Denaturierung der DNS und ihre Immobilisierung auf dem Nitrocellulose-Membranfilter

Nach der Bestimmung der DNS-Konzentration durch UV-Messung wurde langsam 1 N KOH zur DNS zugegeben, bis eine Konzentration von 0,1 N KOH (pH 13) erreicht war. Die DNS wurde dann 5 - 10 Minuten bei 4° C denaturiert und die Lösung durch Zugabe von 1 N HCl neutralisiert. Der pH-Wert wurde hierbei mit pH-Papier kontrolliert, weil die DNS bei zu saurem pH-Wert ausfällt.

Die SSC-Konzentration wurde durch Zugabe von konzentriertem SSC auf die Konzentration von 6 x SSC eingestellt und die DNS in Mengen von 50 ug oder 100 ug auf Nitrocellulose-Membranfilter aufgetragen, die mit 6 x SSC gesättigt wurden.

Das Filter wurde nach Auftragen der DNS je zweimal auf beiden Seiten mit 15 - 20 ml 6 x SSC gewaschen, danach zunächst 2 Stunden an der Luft und dann 2 Stunden bei 80° C im Vakuum-Exsikkator getrocknet.

b) Inkubation der RNS mit immobilisierter DNS

Die zu hybridisierende RNS wurde in 5 ml 6 x SSC gelöst und in Glas-Scintillator-Röhrchen gefüllt. Das DNS-tragende Filter wurde dann in dieser Lösung 16 Stunden bei 63° C inkubiert, wobei der Deckel des Röhrchens fest verschlossen war. Die Inkubation wurde durch Abkühlen des Reaktionsgemisches im Eisbad gestoppt.

c) RNase-Behandlung und Auswertung

Nach der Inkubation wurde das Filter auf beiden Seiten je einmal mit 6 x SSC und 2 x SSC gewaschen und dann in eine RNase-Lösung (50 ug/ml 2 x SSC) übertragen. Nach 90 Minuten Inkubation bei 37° C wurde die Waschprozedur wiederholt und das Filter schließlich 60 Minuten bei 80° C getrocknet.

Die auf ihm verbliebene Radioaktivität wurde in Toluol-Scintillatorflüssigkeit bestimmt.

K) RNS-RNS-Hybridisierung

Die RNS-RNS-Hybridisierung wurde im Prinzip nach der Methode von Weissman et al. (89) durchgeführt. RNS wurde in 0,2 ml von 2 x SSC Puffer aufgenommen und in einer verschlossenen Ampulle 1 Stunde lang bei 85° C erhitzt. Die Temperatur wurde dann durch langsames Abkühlen über ca. 5 Stunden auf 35° C gebracht. Zuletzt wurden die Reaktionsgemische ins Eisbad verbracht und mit 1 x SSC auf 1 ml verdünnt. Nach Zugabe von 60 ug/ml RNase wurde dann 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, das RNase-resistente Material anschließend nach Zusetzen von 200 ug Serumalbumin mit 10 %iger kalter Trichloressigsäure (TCE) präzipitiert und auf einem Membranfilter (MF-100) durch Filtration gesammelt. Das Filter wurde mit 4 %iger TCE gewaschen, bei 80° C 30 Minuten getrocknet und die Radioaktivität in Toluol-Scintillatorflüssigkeit gemessen.

IV. ERGEBNISSE

Für die Untersuchungen, die zur Entdeckung der 26 S und 16 S RNS in Leukoseviren geführt hatten, war vornehmlich das Hühner-Myeloblastose-Virus verwendet worden (7,22,50). Dieses Virus (Plasma-AMV) hat den Vorteil, daß es in ungewöhnlich hoher Konzentration im Blut von Myeloblastose-kranken Küken vorkommt. Ein ml Blutplasma kann bis zu 10^{12} Virusteilchen enthalten (14), was etwa 1 mg Virus entspricht. Dieses Material war deshalb auch besonders geeignet, um RNS, die wie die 26 und 16 S RNS nur in relativ geringer Menge im Virus enthalten ist, durch UV-Absorption nachzuweisen.

Die Virusproduktion in Hühnerembryo-Zellkulturen ist demgegenüber relativ gering. Da der größte Teil der vorliegenden Untersuchungen mit Virus aus Zellkulturen durchgeführt werden mußte, wurde ein sich in Kulturen relativ gut vermehrendes Virus, nämlich MAV-B, ausgewählt, von dem man unter unseren Bedingungen innerhalb eines Tages immerhin noch bis zu 10^{9} Virusteilchen/ml Gewebekulturflüssigkeit erhält. Um Material zu sparen, wurde die RNS dieses Virus durch radioaktive Markierung erfaßt.

Als Vergleich zu den bereits vorliegenden Untersuchungen wurde zunächst die RNS aus Plasma-AMV isoliert und, soweit möglich, mit der aus MAV-B gewonnenen quantitativ und qualitativ verglichen. Die weitere Charakterisierung der 26 und 16 S erfolgte dann ausschließlich mit MAV-B-RNS.

A) Nachweis der 26 und 16 S RNS in Plasma-AMV

Aus 5 mg gereinigtem Plasma-AMV, was etwa 5 - 10 x 10^{12} Virusteilchen entspricht, wurde durch Phenol-SDS-Behandlung die RNS extrahiert und im Saccharose-Gradienten oder in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert. Abb. 5 zeigt die Auftrennung der Gesamtvirus-RNS im Saccharose-Gradienten. Außer den zwei Hauptgipfeln I und IV, die der 60 S bzw. der 4 S RNS entsprechen, sind noch zwei kleinere Gipfel II und III festzustellen.

Die Analyse der Plasma-AMV-RNS mittels Gel-Elektrophorese führte zu einem analogen Ergebnis. Die RNS wurde nach Elektrophorese im Densitometer analysiert und anschließend mit Methylenblau angefärbt (Abb. 6). Hierbei zeigte sich eine weitere RNS-Bande, deren Sedimentationskonstante auf etwa 9 S abgeschätzt werden kann. Sie stellt möglicherweise messenger-RNS der Wirtszelle dar (Bolognesi, unveröffentlichte Ergebnisse) und bedarf noch genauerer Untersuchungen.

B) Nachweis der RNS-Komponenten II und III in MAV-B

Zur radioaktiven Markierung der Virus-RNS wurden MAV-B-infizierte Hühnerembryo-Zellkulturen mit 100 uCi/ml ^{32}P-Orthophosphat 20 Stunden lang inkubiert. Nach Reinigung des Virus aus dem Nährmedium wurde die Virus-RNS, wie unter Methoden beschrieben, extrahiert und im Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Der mittlere von je 16 Tropfen jeder Fraktion wurde zur Bestimmung der Radioaktivität benützt. Das Ergebnis eines solchen Experimentes ist in Abb. 7 dar-

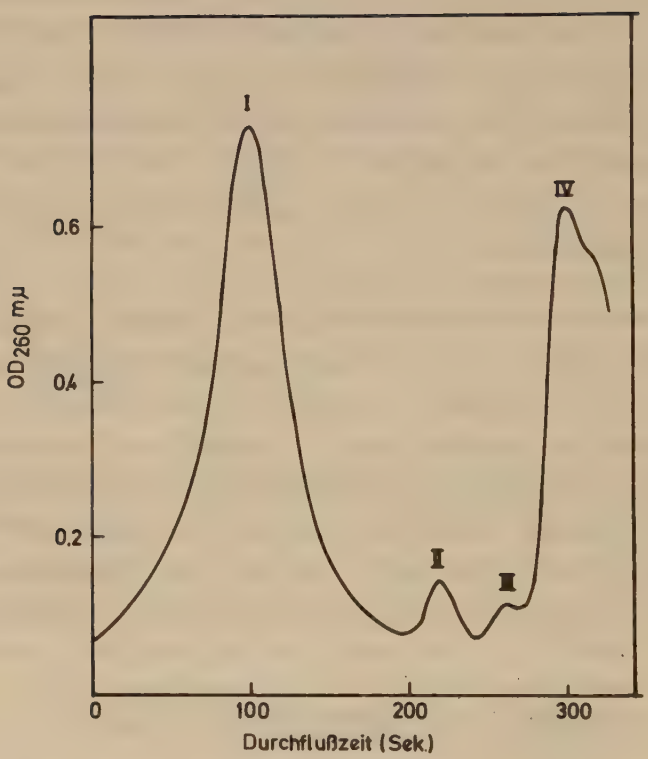


Abb. 5

Fraktionierung der AMV-RNS durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation (5 - 20 % Saccharose-Lösung, 50 Minuten 50 000 UpM im SW 50 Rotor).

Die RNS wurde durch UV-Absorption in einer Durchflußzelle (Zeiss-Spektralphotometer) bestimmt.

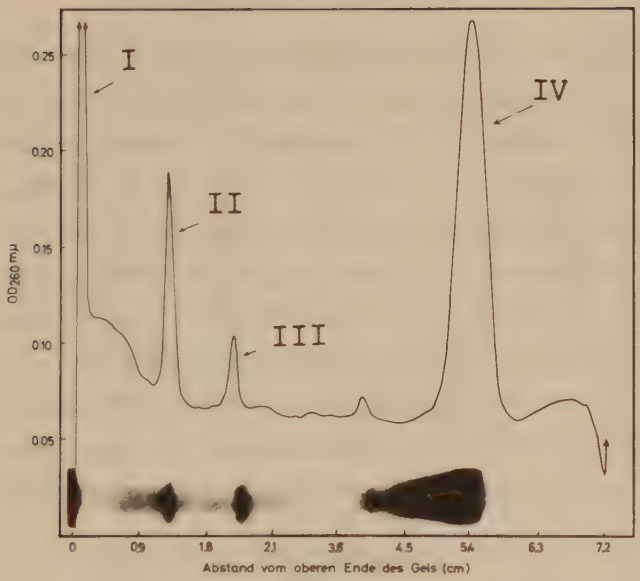


Abb. 6

Gel-Elektrophorese der AMV-RNS.

50 ug AMV-RNS wurde in Polyacrylamidgel (enthaltend 0,06 % Äthylendiacrylat) 70 Minuten bei 70 V/cm und 5 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurden die RNS-Banden in einem Guilford Gel-Scanner durch Messung der UV-Absorption bei 260 mu bestimmt (Kurve) und zuletzt die RNS-Banden nach Methylenblau-Färbung fotografiert (schwarze Banden).

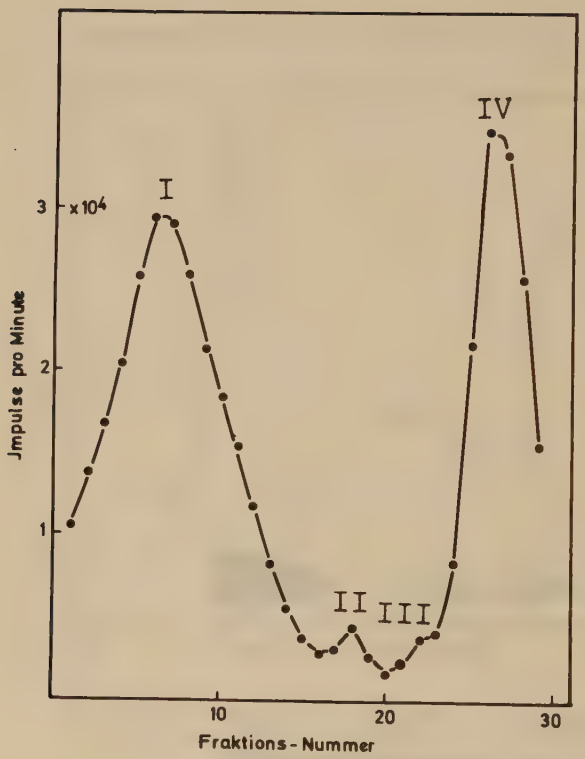


Abb. 7

Fraktionierung der ^{32}P-markierten MAV-B-RNS.

^{32}P-markierte MAV-B-RNS wurde nach Saccharose-Gradienten-Zentrifugation (60 Minuten bei 50 000 UpM im SW 50 Rotor) fraktioniert und die Radioaktivität jeder Fraktion in Dioxan-Scintillatorflüssigkeit gemessen.

gestellt. Ebenso wie beim Plasma-AMV sind zwei deutliche kleinere Gipfel zwischen der 60 S und der 4 S RNS erkennbar.

C) Bestimmung des Sedimentationsverhaltens der RNS-Komponenten II und III

Zunächst wurde das Sedimentationsverhalten der Komponenten II und III aus MAV-B mit dem von Ribosomen-RNS verglichen. Hierzu wurden die Fraktionen 14 - 22 aus dem in Abb. 7 dargestellten Experiment vereinigt und gemeinsam mit Ribosomen-RNS aus HE-Zellen mit Alkohol präzipitiert. Nach Lösen der RNS in Puffer wurde sie erneut in einem Saccharose-Gradienten zentrifugiert. Die RNS-Gipfel wurden dann mittels UV-Absorption (Ribosomen-RNS) bzw. Messung der Radioaktivität (Virus-RNS) jeder Fraktion bestimmt. Wie in Abb. 8 gezeigt wird, sind die RNS-Komponenten II und III in ihrem Sedimentationsverhalten von Ribosomen-RNS nicht zu unterscheiden.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Komponenten II und III aus MAV-B und Plasma-AMV gleiche Sedimentationseigenschaften besitzen. Hierzu wurden zunächst die Komponenten II und III aus MAV-B bzw. Plasma-AMV durch Extraktion und Zentrifugation der Gesamt-RNS im Saccharose-Gradienten isoliert, danach wurden die Komponenten II und III beider Viren vereinigt und nach Alkohol-Präzipitation erneut in einem Saccharose-Gradienten zentrifugiert. Die RNS von Plasma-AMV wurde, wie bisher üblich, durch UV-Absorption, die aus MAV-B durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Wie in Abb. 9 dargestellt ist, weisen die Komponenten II bzw. III aus den beiden Viren ein gleiches Sedimentationsverhalten auf.

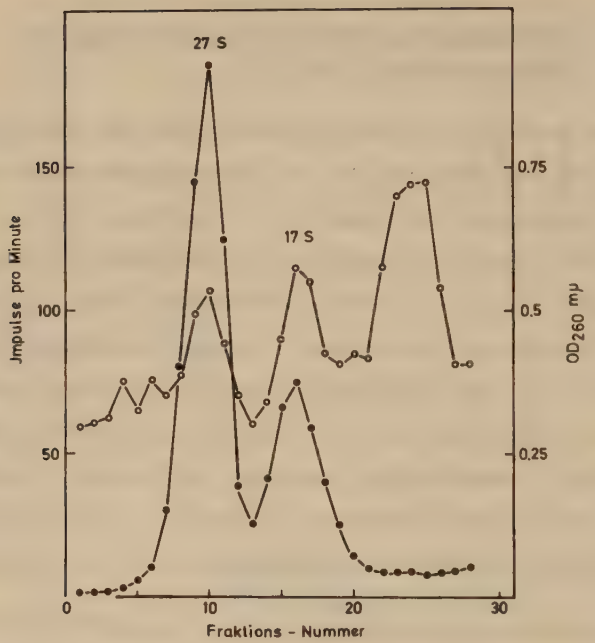


Abb. 8

Fraktionierung der niedermolekularen MAV-B-RNS gemeinsam mit Ribosomen-RNS aus Hühnerembryozellen.

Die Fraktion 15 - 21 aus dem in Abb. 7 dargestellten Versuch wurden vereinigt und zusammen mit nicht radioaktiv markierter Ribosomen-RNS mit Alkohol präzipitiert. Das RNS-Gemisch wurde dann in einem 5 - 20 %igen Saccharose-Gradienten 135 Minuten bei 50 000 UpM zentrifugiert und fraktioniert. Die Radioaktivität und UV-Absorption jeder Fraktion wurden bestimmt.

o——o Radioaktivität (^{32}P)
●——● UV-Absorption

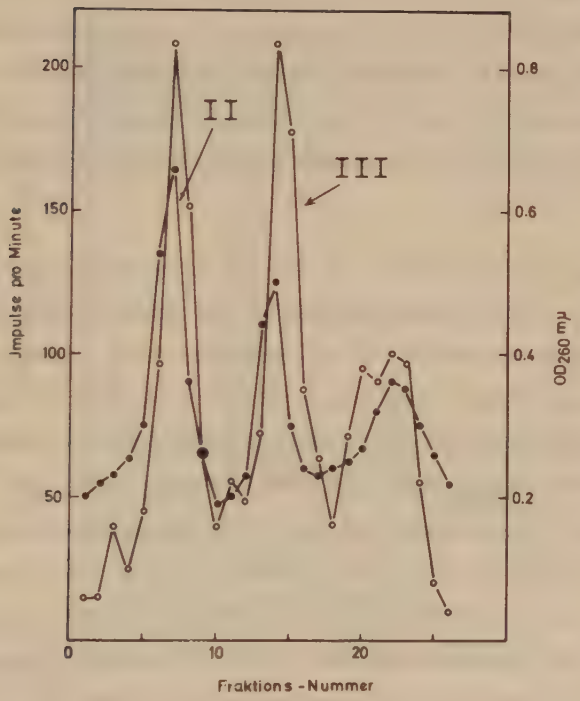


Abb. 9

Ko-Zentrifugierung der niedermolekularen RNS aus MAV-B und AMV.

Die RNS-Komponenten II und III aus AMV und MAV-B wurden vereinigt und nach Konzentrierung mittels Alkohol-Präzipitation erneut durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation aufgetrennt (135 Minuten bei 50 000 UpM im SW 50 Rotor).

o——o ^{32}P-Radioaktivität der MAV-B-RNS
●——● UV-Absorption der AMV-RNS

Ein genauerer Größenvergleich der Komponenten II und III mit Ribosomen-RNS wurde mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt. Hierbei wurde ^{32}P-markierte Virus-RNS aus MAV-B mit ^{3}H-markierter Ribosomen-RNS gemischt und dann aufgetrennt. Wie in Abb. 10 dargestellt, ergab die Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Gelabschnitten für die RNS-Komponenten II und III die gleichen Wanderungsgeschwindigkeiten wie für die entsprechenden Ribosomen-Ribonucleinsäuren.

Um die S_{20} der Komponenten II und III möglichst exakt zu bestimmen, wurden Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt. Da die Ribosomen-RNS leichter in den dafür erforderlichen Mengen hergestellt werden konnte, wurden diese Untersuchungen mit Ribosomen-RNS aus Hühnerembryozellen durchgeführt. Die beiden Komponenten der zellulären Ribosomen-RNS wurden im Saccharose-Gradienten isoliert (Abb. 11) und einzeln in der Konzentration von OD_{260} = 0,80 in TSE-Puffer bei 44 770 UpM und 20° C zentrifugiert. Die Sedimentation der RNS wurde durch Aufnahmen im UV-Licht im Abstand von 4 Minuten verfolgt (Abb. 12). Die aus dem Sedimentationsverhalten errechneten S_{w20}-Werte betrugen 27 bzw. 17 S. Die mit der gleichen Methode vergleichsweise durchgeführte Bestimmung der S_{20} der 60 S Virus-RNS ergab einen Wert von 62 S, was genau dem von Bauer nach Saccharose-Gradienten-Zentrifugation abgeschätzten Wert entspricht (7).

Da sich die Virus-RNS-Komponenten II und III in ihrem Sedimentationsverhalten im Zuckergradienten bzw. in ihrer

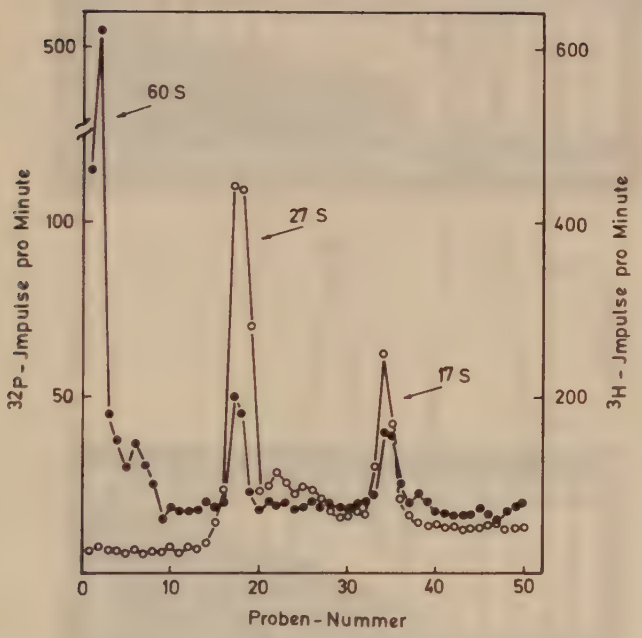


Abb. 10

Ko-Fraktionierung von MAV-B-RNS mit Ribosomen-RNS.

^{32}P-markierte Virus-RNS wurde mit ^{3}H-markierter Ribosomen-RNS gemischt und in einem Polyacrylamidgel (2,1 % Acrylamid, 0,06 % Äthylendiacrylat, 5 % Agarose) bei 4° C, 10 V/cm, 5 mA/Gel 75 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde dann mit einem scharfen Messer in Stücke zerschnitten, die durch Kochen in 0,1 % Piperidin gelöst wurden. Anschließend wurde zur Bestimmung der Radioaktivität Dioxan-Scintillatorflüssigkeit zugegeben.

●——● ^{32}P
o——o ^{3}H-Uridin

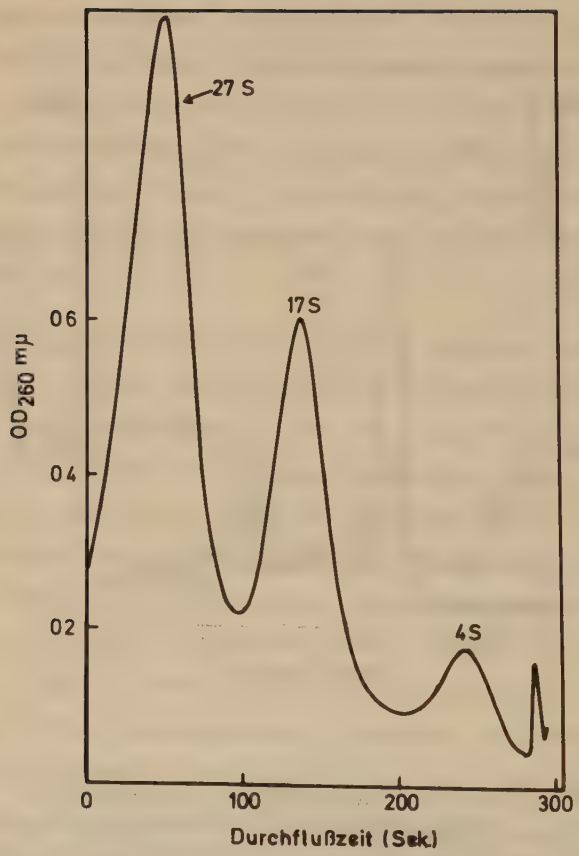
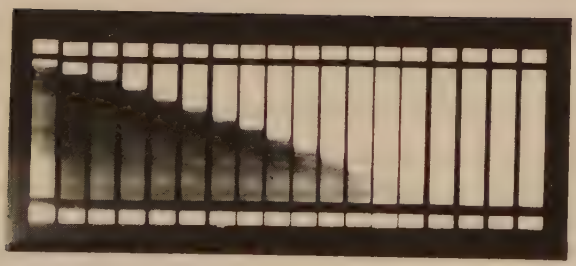


Abb. 11

Isolierung von Ribosomen-RNS aus Hühnerembryozellen.

Nach Zentrifugation im Saccharose-Gradienten wurden die RNS-Banden durch Messung der UV-Absorption im Durchfluß-UV-Spektralphotometer bestimmt.

17 S RNS



27 S RNS

Abb. 12

Bestimmung der Sedimentationskonstanten von Ribosomen-RNS in der analytischen Ultrazentrifuge.

Durch Aufnahmen im UV-Licht im Abstand von 4 Minuten wurde das Sedimentationsverhalten der beiden Ribosomen-RNS-Komponenten in TSE-Puffer bei 44 770 UpM und 20° C verfolgt.

Wanderungsgeschwindigkeit in der Gel-Elektrophorese von der Ribosomen-RNS nicht unterschieden, werden auch für sie 27 S (II) bzw. 17 S (III) als Sedimentationskonstanten angenommen. Im Verlauf der weiteren Darstellung werden sie als 27 bzw. 17 S RNS bezeichnet.

D) Quantitative Untersuchung der 27 und 17 S RNS des Virus

1. Bestimmung des Mengenverhältnisses der verschiedenen RNS-Komponenten

Die mengenmäßige Verteilung der verschiedenen RNS-Komponenten des Virus wurden aufgrund ihrer UV-Absorption (Plasma-AMV) und ihrer radioaktiven Markierung (^{32}P-markiertes MAV-B) abgeschätzt. Während das Mengenverhältnis der 60 S RNS zur 4 - 5 S RNS von Versuch zu Versuch variierte, blieben die Anteile der 27 und 17 S RNS verhältnismäßig konstant, nämlich etwa 5 % der gesamten Virus-RNS (Tabelle II). Das unterschiedliche Verhältnis der 60 S zur 4 S RNS erklärt sich wohl durch eine von Versuch zu Versuch in ihrem Ausmaß schwankende Degradierung der 60 S RNS zu kleineren RNS-Molekülen, die im Bereich von 4 - 5 S sedimentieren.

2. Stöchiometrische Untersuchungen

Bonar u. Mitarb. hatten berechnet, daß pro Virusteilchen Plasma-AMV je ein Molekül 27 und 17 S RNS vorhanden sind. Wir untersuchten dieselbe Frage beim MAV-B, indem die Menge der vorhandenen Viruspartikeln durch direkte Zählung im Elektronenmikroskop bestimmt und die 27 und 17 S RNS auf-

TABELLE II

Verteilung der verschiedenen RNS-Komponenten in MAV-B und AMV

RNS	60 S		27 + 17 S		4 - 5 S	
^{32}p-MAV-B[a]	cpm	%	cpm	%	cpm	%
Exp.1	$3,55 \times 10^6$	60,5	$0,13 \times 10^6$	5,4	$0,83 \times 10^6$	34,1
Exp.2	$1,20 \times 10^6$	65,7	$0,096 \times 10^6$	4,9	$0,57 \times 10^6$	29,4
AMV[b]	ug	%	ug	%	ug	%
Exp.1	323	73,0	24	5,4	97	21,6
Exp.2	84	59,0	6,6	4,6	52	36,4
Exp.3	108	39,0	16,5	6,0	152	55,0

[a] Die Radioaktivität wurde nach Fraktionierung durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation gemessen.

[b] Die RNS-Menge wurde nach der UV-Absorption der einzelnen Fraktionen abgeschätzt.

grund ihrer UV-Absorption quantitativ abgeschätzt wurden. Die Berechnung der RNS-Moleküle/Virusteilchen erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\frac{\text{Zahl der Moleküle (Z.M.)}}{\text{g RNS}} = \frac{\text{Lochschmidt'sche Zahl}}{\text{Molekulargewicht (MG) der RNS (in Daltons)}} \qquad (1)$$

$$\text{ug der RNS} = \frac{\text{IpM der RNS}}{\text{Spez. Akt. der RNS}} \qquad (2)$$

Durch Einsetzen von (2) in (1) ergibt sich:

$$\text{Absolute Z.M.} = \frac{6{,}02 \times 10^{17} \times \text{IpM der RNS}}{\text{MG der RNS} \times \text{Spez. Akt. der RNS}} \qquad (3)$$

Zur Berechnung der Molekülzahl pro Virusteilchen muß der Wert aus Formel (3) durch die Anzahl der Viruspartikeln dividiert werden.

Für diese Berechnungen wurde das Molekulargewicht der RNS anhand der Spirin'schen Formel (71a) mit $1{,}55 \times 10^5$ für die 17 S RNS und $5{,}6 \times 10^5$ für die 27 S RNS ermittelt.

Das in Tabelle III dargestellte Ergebnis besagt, daß pro Virusteilchen etwa je 1 Molekül 27 und 17 S RNS vorhanden sind.

Wenn man die Mengenberechnung der RNS anhand ihrer Radioaktivität vornimmt, so findet man pro Virusteilchen einen etwas höheren Wert für die 17 S RNS. Möglicherweise beruht dies darauf, daß die 17 S RNS schneller als die 27 S RNS aus dem Zellkern in das Cytoplasma übertritt. Nach Untersuchungen von Perry (60) und Girard et al. (44) wird eine maximale radioaktive Markierung der 27 S Ribosomen-RNS im Cytoplasma erst nach 12 Stunden erreicht. Demnach würde bei dem in der ersten Zeit nach radioaktiver Markierung

TABELLE III

Quantitative Abschätzung der 27 und 17 S RNS in einem Viruspartikel

	RNS-Menge gemessen in IpM[a] bzw. ug[b]		Spezifische Aktivität der RNS[c]		Anzahl der Viruspartikeln[d]	Errechnete Anzahl der RNS-Moleküle pro Viruspartikel	
	27 S	17 S	27 S	17 S		27 S	17 S
Exp.1	$1,16 \times 10^4$ cpm	$1,10 \times 10^4$ cpm	$2,88 \times 10^5$	$2,30 \times 10^5$	$3,0 \times 10^{10}$	0,66	1,73
Exp.2	$1,78 \times 10^4$ cpm	$1,58 \times 10^4$ cpm	$3,63 \times 10^5$	$3,55 \times 10^5$	$2,5 \times 10^{10}$	0,80	1,94
Exp.3	2,4 ug	1,4 ug	-	-	$1,4 \times 10^{12}$	0,84	1,14

[a]Die radioaktive RNS ist aus MAV-B isoliert.

[b]Die in ug angegebene RNS ist aus AMV isoliert.

[c]Die spezifische Aktivität (IpM/ug) wurde anhand der zellulären Ribosomen-RNS bestimmt.

[d]Die Anzahl der Viruspartikeln wurde elektronenmikroskopisch bestimmt.

synthetisierten Virus die 17 S RNS eine höhere spezifische Radioaktivität besitzen als die 27 S RNS.

E) Nachweis der Integration von 27 und 17 S RNS in das Virion

Aus den bisherigen Versuchen geht hervor, daß sowohl Virus aus Plasma-AMV wie auch aus Hühnerembryonalzellen 27 und 17 S RNS enthalten. Diese RNS-Komponenten wurden von anderen Autoren entweder aufgrund eines ungenügenden Trennverfahrens nicht entdeckt oder aber auf eine Kontamination mit Zelldetritus zurückgeführt bzw. nicht diskutiert. Obwohl wir mit Viren unterschiedlichen Gehalts an Zellmaterial das gleiche Ergebnis erzielten und die Virusquellen, nämlich Hühnerplasma und Zellkulturmedium, vermutlich recht unterschiedliche Mengen an Zelldetritus enthalten, wurden eine Reihe von weiteren Versuchen unternommen, um den Einwand zu entkräften, daß die 27 S und 17 S RNS aus einer Verunreinigung der Viruspräparate mit zellulären Bestandteilen herrühren.

1. Reinigung des Virus

Die zunächst zu untersuchende Frage war, ob das Reinigungsverfahren ausreichte, um das Virus von Zelldetritus zu trennen. Für den letzten Reinigungsschritt, nämlich das Banden des Virus im Saccharose-Gradienten, hat Bauer bereits mittels Komplementbindungsreaktion gezeigt, daß das Virus vorwiegend in der mittleren Bande enthalten ist (12)(Abb. 2). Dies wurde in eigenen Untersuchungen mit ^{32}P markiertem Virus bestätigt. Es konnte gezeigt werden, daß in der oberen Bande ^{32}P enthalten ist, das z.T. ausdialysiert

werden kann. Bei diesem Material dürfte es sich um freies ^{32}P sowie andere niedermolekulare Bestandteile bzw. solche mit geringer Dichte handeln. Die spezifische Radioaktivität der mittleren Bande ist weitaus höher als die der unteren. Dies weist daraufhin, daß letztere neben Virusaggregaten auch nicht-RNS-haltigen Zelldetritus enthält, der durch dieses Verfahren vom Virus abgetrennt wird.

Wenn nun die 27 und 17 S RNS des Virus aus einer Kontamination mit zellulärem Material herrührt, sollte man erwarten, daß nach Extraktion und Auftrennung der RNS der unteren Zelldetritus-haltigen Bande der Anteil an 27 und 17 S RNS verhältnismäßig größer sein müßte als in der aus der mittleren Bande isolierten RNS. Um dies zu prüfen, wurden die RNS der mittleren und unteren Bande isoliert und im Saccharose-Gradienten aufgetrennt (Abb. 13). Wie in Tabelle IV aufgeführt ist, wurde in den beiden Banden kein Unterschied in dem relativen Gehalt an 27 und 17 S im Vergleich zur 60 und 4 - 5 S RNS festgestellt. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die 27 und 17 S RNS des Virus nicht aus einer Kontamination mit Zelldetritus herrührt.

2. RNase-Behandlung des Virus vor RNS-Extraktion

Es besteht die Möglichkeit, daß Zellbestandteile, z.B. Ribosomen-Partikel, an der Oberfläche der Virushülle so fest haften, daß sie durch die angewendeten Reinigungsschritte nicht entfernt werden können. In diesem Falle sollte die Ribosomen-RNS durch RNase-Behandlung zerstört

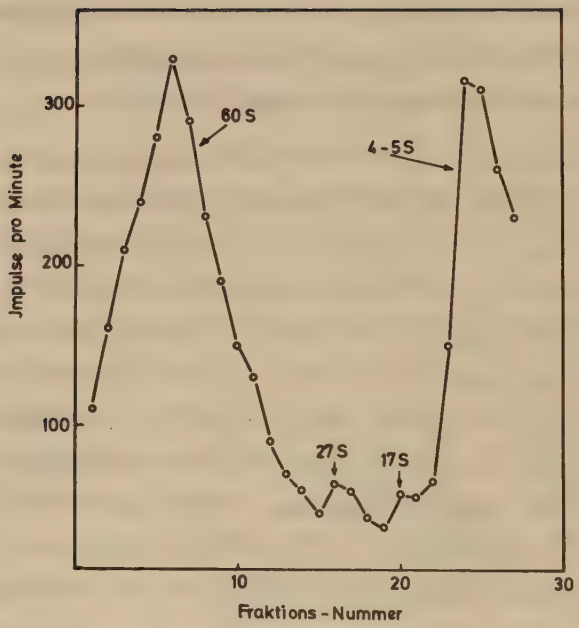


Abb. 13

RNS-Verteilung in der unteren Bande eines Saccharose-Gradienten nach Virusreinigung.

TABELLE IV

Verteilung der 60 S, 27 + 17 S und 4 - 5 S RNS der mittleren und unteren Bande nach Virusreinigung im Saccharose-Gradienten

RNS isoliert aus	RNS	cpm	% der Gesamt-RNS
mittlerer Bande	60 S	$3,55 \times 10^6$	60,5
	27+17 S	$0,13 \times 10^6$	5,4
	4-5 S	$0,83 \times 10^6$	34,1
unterer Bande	60 S	$2,59 \times 10^5$	63,9
	27+17 S	$0,22 \times 10^5$	5,4
	4-5 S	$1,25 \times 10^5$	30,7

^{32}P-markiertes Virus wurde im Saccharose-Gradienten zentrifugiert, und die RNS aus der mittleren und unteren Bande extrahiert. Nach Fraktionierung derselben im 5 - 20 %igen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (Abb. 13) wurde die Gesamt-Radioaktivität der einzelnen RNS-Komponenten bestimmt.

werden. Um dies zu prüfen, wurde MAV-B mit ^{32}P-Orthophosphat markiert und auf die übliche Weise im Saccharose-Gradienten gereinigt. Die mittlere Virusbande wurde isoliert und in zwei gleichgroße Portionen geteilt. Beide Portionen wurden 30 Minuten bei 25° C inkubiert, die eine nach Zugabe von 10 ug/ml RNase. Anschließend wurden die beiden Virusproben in der Ultrazentrifuge sedimentiert, das Sediment in 2 ml TSE-Puffer suspendiert und zur Inhibition eventuell noch vorhandener RNase 200 ug/ml Bentonit zugefügt. Danach wurde die RNS auf die übliche Weise extrahiert und die Komponenten im Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Der 27 bis 17 S Bereich wurde isoliert und erneut im Saccharose-Gradienten zentrifugiert. Nach Fraktionierung wurde der Gehalt der beiden Virusproben an 27 und 17 S RNS verglichen. Wie in Abb. 14 zu erkennen ist, konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden.

3. Suche nach Ribosomen-ähnlichen Partikeln in der virushaltigen Ausgangsflüssigkeit

Eine weitere Ursache für die Existenz der 27 und 17 S RNS in gereinigtem Virus könnte darin bestehen, daß RNS-haltige Zellkomponenten mit einem ähnlichen Sedimentationsverhalten wie das Virus im Zellkulturmedium enthalten sind. Dies wurde geprüft, indem nichtinfizierte Hühnerzellkulturen mit ^{32}P-Orthophosphat markiert wurden und das Nährmedium einen Tag später der gleichen Prozedur wie bei einer Virusreinigung unterworfen wurde. Das Material, das dem Bereich der mittleren Virusbande entsprach, wurde aus dem Saccharose-Gradienten isoliert und auf die gleiche Art mit Phenol

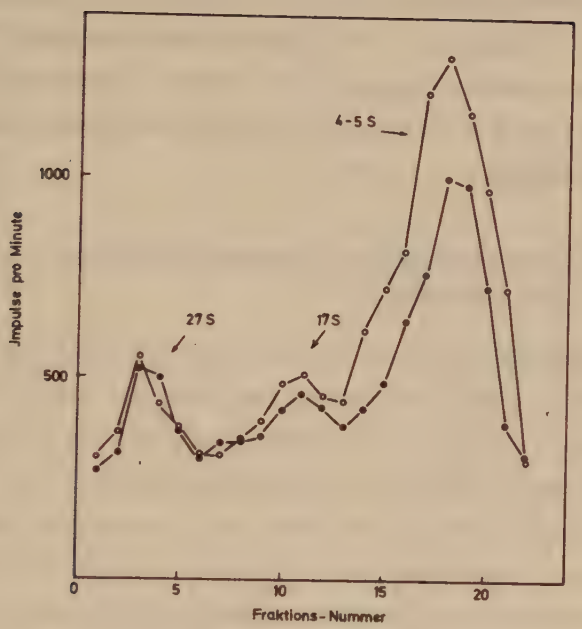


Abb. 14

Verteilung der niedermolekularen RNS in MAV-B nach RNAse-Behandlung des Virus vor RNS-Extraktion.

^{32}P-radioaktiv markiertes MAV-B wurde nach Reinigung in zwei Portionen geteilt, von denen eine 30 Minuten mit 10 ug/ml RNAse bei 25° C inkubiert wurde. Die andere diente als Kontrolle und wurde ohne Zusatz von RNAse unter gleichen Bedingungen gehalten. Nach Zugabe von TSE-Puffer mit 200 ug/ml Bentonit wurde die RNS aus beiden Virusproben extrahiert und durch zweimalige Saccharose-Gradienten-Zentrifugation aufgetrennt. In der Abbildung ist die RNS-Verteilung nach dem 2. Zentrifugen-Lauf dargestellt.

●——● RNAse-Behandlung
o——o Kontrolle

extrahiert wie sonst die Virusbande. Das so isolierte Material wurde mit Tritium-markierter Ribosomen-RNS zusammen im Saccharose-Gradienten analysiert (Abb. 15). Es konnte keinerlei ^{32}P-Radioaktivität im Bereich der Ribosomen-RNS nachgewiesen werden. Die im 4 - 5 S Bereich gefundene RNS ist weniger als 0,01 % der unter gleichen Bedingungen im Virus vorhandenen 4 - 5 S RNS.

4. Untersuchungen nach Kurzzeit-Markierung der Virus-RNS

Als die Versuche für diese Arbeit nahezu abgeschlossen waren, erschien eine Publikation von Bader und Steck, in der behauptet wurde, daß die niedermolekulare RNS in HLS-Viren und den in Struktur und Reifungsmechanismus verwandten Mäuse-Leukämie-Viren (MLV) (32) daher rühre, daß das Virus in Intervallen von 1 - 2 Tagen aus dem Zell-Nährmedium geerntet worden sei (4). Während eines solchen Zeitraumes sollten zahlreiche Zellen degenerieren und deren Zelltrümmer dann im Medium schwimmen.

Bader und Steck hatten in ihren Versuchen MLV-infizierte Mäuseembryo-Zellkulturen mit Tritium-Uridin-haltigem Medium 1 Stunde lang inkubiert. Nach Auswechseln des Tritium-haltigen mit normalem Medium wurde das Virus im Abstand von 1 Stunde 5mal geerntet. Nach Virusreinigung wurde die RNS isoliert und in der Polyacrylamid-Elektrophorese analysiert. Es fand sich radioaktiv-markierte RNS nur im 60 S Bereich. Da mit der von diesen Autoren verwendeten Technik der Virusreinigung kein höherer Reinheitsgrad als mit unserer Methode erzielt wird, scheinen diese Ergebnisse nicht auf einer

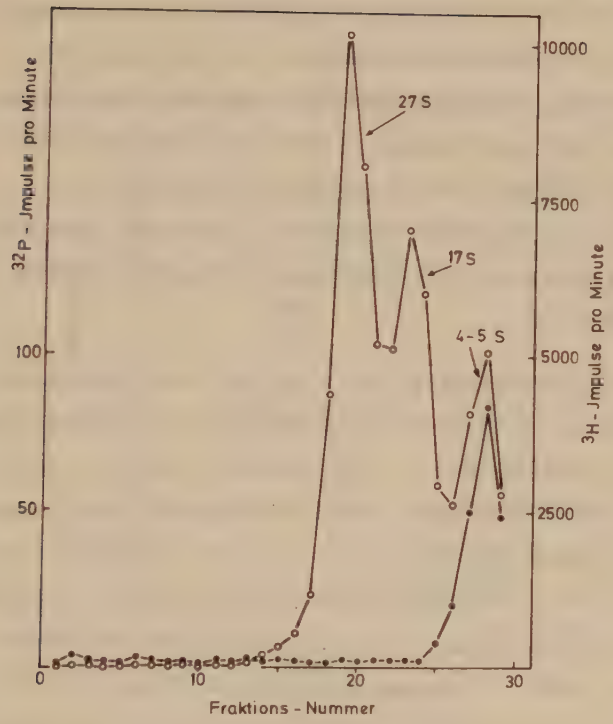


Abb. 15

Untersuchung von Zellkultur-Nährmedium auf niedermolekulare RNS.

Nichtinfizierte Hühnerembryozellkulturen wurden mit ^{32}P-Orthophosphat inkubiert und das Medium nach 24 Stunden den üblichen Virus-Reinigungsschritten unterworfen. Die der mittleren Bande entsprechenden Fraktionen des Saccharose-Gradienten wurden mit SDS-Phenol behandelt. Das so extrahierte Material wurde mit ^{3}H-Uridin markierter Ribosomen-RNS zusammen im Saccharose-Gradienten analysiert (SW 50, 50 000 UpM, 60 Minuten).

●—● ^{32}P
○—○ ^{3}H-Uridin

besseren Virusreinigung zu beruhen. Man kann aber aufgrund unserer stöchiometrischen Berechnungen und dem Nachweis der unterschiedlichen spezifischen Radioaktivität der verschiedenen Virus-RNS-Komponenten vermuten, daß im Falle der Experimente von Bader und Steck die Dauer der radioaktiven Markierung nicht ausreichte, um neben der Virus-RNS auch zelluläre Ribosomen- bzw. Transfer-RNS zu markieren, da diese sehr viel langsamer als die 60 S Virus-RNS umgesetzt werden. Um dies zu prüfen, wurden noch folgende Versuche durchgeführt:

Von 20 großen Petrischalen (Ø 14 cm) mit MAV-B infizierter HE-Zellkulturen wurde mehrmals hintereinander in 1stündigem Abstand das Medium geerntet und gesammelt. Das Virus wurde dann aus diesem Nährmedium durch Ammonsulfat-Fällung ausgefällt und danach mit der üblichen Methode konzentriert und gereinigt. Die erhaltene Viruskonzentration war so hoch, daß die RNS nach Isolierung und Fraktionierung im Saccharose-Gradienten mittels UV-Absorption gemessen werden konnte. Wie in Abb. 16 zu sehen ist, zeigten sich deutliche Gipfel der 27 und 17 S RNS. In einem zweiten Ansatz wurden nach der Methode von Bader und Steck die gleichen MAV-B infizierten HE-Zellkulturen mit 100 uC/ml ^{32}P-Orthophosphat 1 Stunde lang markiert, danach das radioaktive Medium durch kaltes Medium ersetzt und die Zellüberstände im Abstand von 1 Stunde mehrmals geerntet. Nach Reinigung des Virus und RNS-Extraktion aus demselben wurde die RNS in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert. Ebenso wie im Experiment von Bader und Steck konnte keine 27 bzw. 17 S RNS, wohl aber 60 S festgestellt werden (Abb. 17). Daß im Unterschied zu den

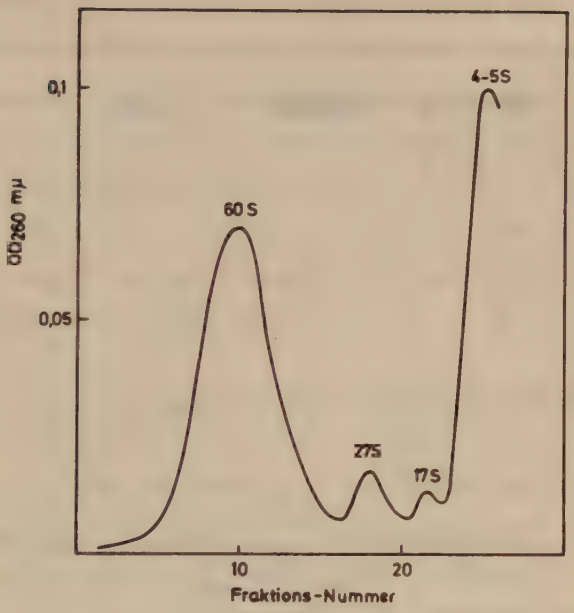


Abb. 16

Fraktionierung der RNS aus kurzzeitig geerntetem MAV-B.

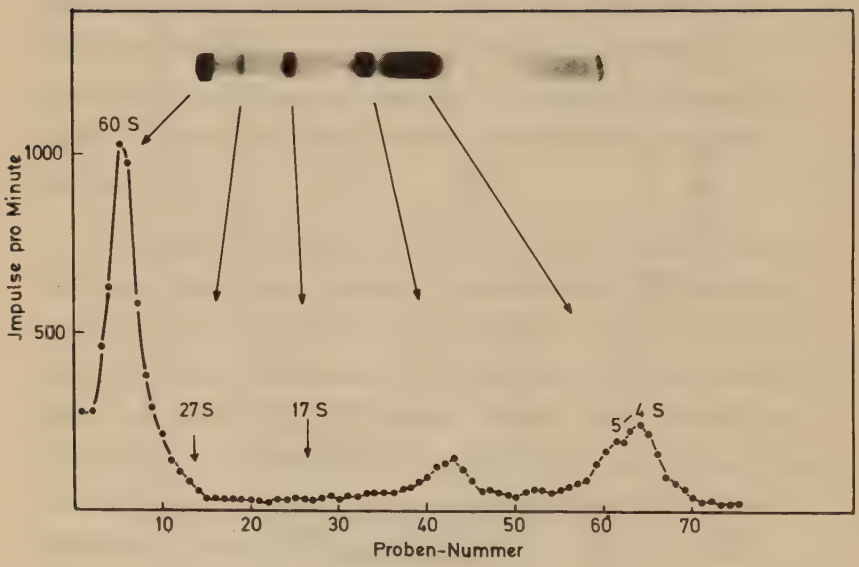


Abb. 17

Polyacrylamidgel-Elektrophorese der RNS aus kurzzeitig geerntetem MAV-B.

Die Kurve stellt die Verteilung der Radioaktivität im Gel dar. Das Gel zeigt im Vergleich dazu die Verteilung der RNS aus AMV.

Ergebnissen von Bader und Steck kleinere Gipfel von 4 - 5 S und etwa 9 S RNS vorhanden waren, ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß wir ^{32}P und nicht, wie diese Autoren, Uridin zur RNS-Markierung verwendeten. ^{32}P wird schneller als Uridin von der Zelle aufgenommen und zur Synthese verwendet.

Das Ergebnis unserer Versuche macht deutlich, daß man nach einem 1stündigen radioaktiven Puls wohl die Virus-RNS und schnell metabolisierende zelluläre RNS (4 - 5 S und 9 S), nicht aber die zelluläre Ribosomen-RNS markieren kann, obwohl letztere bei ausreichender Konzentration durch UV-Absorption nachweisbar ist.

F) Untersuchungen über die Basenzusammensetzung der RNS

Nach den bisher beschriebenen Untersuchungen scheinen die im Virus enthaltenen 27 und 17 S RNS Komponenten Ribosomen(r)-RNS aus der Wirtszelle darzustellen. In diesem Falle müßten sie auch die Basenzusammensetzung der Ribosomen-RNS aufweisen. Diese Frage wurde durch vergleichende Untersuchungen geprüft.

Mit den bereits beschriebenen Methoden wurden die verschiedenen Virus-RNS-Komponenten aus ^{32}P-markiertem MAV-B und zelluläre Ribosomen-RNS sowie 4 - 5 S RNS aus normalen HE-Zellen isoliert und gereinigt.

Für die Analyse der Basenzusammensetzung durch Hochspannungselektrophorese wurden 10^4 - 10^5 Impulse/Min./RNS-Fraktion verwendet. In Abb. 18 ist die Auftrennung der Nukleotide einer RNS dargestellt.

Abb. 18

Autoradiogramm der 4 Nucleotide der 27 S (links) und 17 S (rechts) RNS aus MAV-B nach Hochspannungselektrophorese.

Die RNS wurde in 3 N KOH hydrolysiert und nach Neutralisierung mit $KClO_4$ durch Hochspannungselektrophorese getrennt (3000 V, 65 mA, bei 2 - 4° C 2 Stunden). Dem Elektrophoresepapier wurde dann ein Röntgen-Film (Kodak) exponiert, auf dem nach Entwicklung die Verteilung der Nucleotide zu erkennen war.

Die Radioaktivität der Nukleotide, die ein Maß für deren relative Menge pro Ansatz darstellt, wurde bestimmt und ist als relativer Prozentgehalt in Tabelle V angegeben. Wie hieraus zu ersehen ist, besitzt die 27 und 17 S RNS des Virus eine sehr ähnliche Basenzusammensetzung wie die Ribosomen-RNS der Wirtszelle. Die Beobachtung, daß der CG-Gehalt der 27 S RNS wesentlich höher ist als der der 17 S r-RNS, stimmt mit Ergebnissen bei anderen tierischen Zellen überein (56). Die gleiche Relation findet sich auch bei der 27 und 17 S RNS des Virus. Der im Vergleich zur Ribosomen-RNS hier etwas niedrigere CG-Gehalt ist wohl dadurch zu erklären, daß während der Aufarbeitung ein Teil der 60 S RNS degradiert wurde und im Bereich der 27 und 17 S RNS sedimentierte; die Basenzusammensetzung der 60 S RNS zeigt in Übereinstimmung mit den Untersuchungen anderer Autoren sehr deutliche Unterschiede zur 27 und 17 S Virus- bzw. Ribosomen-RNS (63,64).

Die zusätzlich durchgeführte Untersuchung der 4 - 5 S RNS des Virus erbrachte für diese eine ähnliche Basenzusammensetzung wie für die 4 - 5 S RNS der Zelle, was nach den Untersuchungen anderer Autoren zu erwarten war (63,64).

G) DNS-RNS-Hybridisierungsversuche

Eine weitere Eigenschaft, die man von der 27 und 17 S RNS erwarten müßte, falls sie überwiegend Ribosomen-RNS darstellt, wäre ihre Hybridisierbarkeit mit zellulärer DNS bzw. die Kompetition dieser Hybridisierung durch Ribosomen-RNS. Entsprechende Versuche wurden mit der Gillespie-Spiegelman-Methode durchgeführt (43).

TABELLE V

Analyse der Basenzusammensetzung[a]

S_{20} der RNS	RNS isoliert aus	C	A	G	U
60 S	Virus	24,0	26,1	29,0	20,9
27 S	Zelle	29,8[b]	17,8	35,5	16,9
	Virus	29,7	19,7	32,0	18,6
17 S	Zelle	27,7	20,0	33,1	19,2
	Virus	25,7	21,8	31,6	20,9
4-5 S	Zelle	27,0	20,0	32,0	21,0
	Virus	28,0	20,0	33,0	19,0

[a]Die Werte für die Zell-RNS sind Durchschnittswerte aus 3 Versuchen und die für Virus-RNS aus zwei Versuchen. Die Fehlerbreite war $\pm$ 0,1 - 0,4 %.

[b]Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Radioaktivität der Nucleotide an.

Ribosomen-RNS bzw. 27 und 17 S Virus-RNS wurden auf die übliche Weise gewonnen und aus technischen Gründen jeweils die beiden Komponenten aus Virus bzw. Zelle vereinigt und als Pool benützt. Da die niedermolekulare Virus-RNS nicht ohne erheblichen Aufwand in größeren Mengen hergestellt werden kann, standen für einen Hybridisierungsansatz nur etwa 5000 Imp./Min. an Virus-RNS zur Verfügung. Um festzustellen, ob dies für ein Hybridisierungsexperiment ausreicht, wurde ein Vorversuch mit ^{32}P-markierter Ribosomen-RNS durchgeführt.

Hierzu wurden 6000 Imp./Min. von ^{32}P-markierter Ribosomen-(r)-RNS mit 50 ug Zell-DNS 16 Stunden lang bei 63° C hybridisiert. In einem gleichzeitigen Ansatz wurde auch die Kompetition dieser Hybridisierung durch Zugabe eines Überschusses von nicht radioaktiv markierter Ribosomen-RNS untersucht. Die in Tabelle VI dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die eingesetzte Radioaktivität für ein derartiges Experiment ausreicht. Die Hybridisierungsrate der Ribosomen-RNS mit DNS aus infizierten und nichtinfizierten Zellen ist etwa gleich. Für die folgenden Versuche wurde DNS aus MAV-B infizierten HE-Zellen verwendet.

5000 Imp./Min. an gereinigter niedermolekularer Virus-RNS (27 S + 17 S) wurden mit 100 ug Zell-DNS hybridisiert. In weiteren gleichzeitigen Ansätzen wurde versucht, die Hybridisierung durch Zugabe verschiedener RNS zu kompetitieren. Wie aus Tabelle VI und VII zu ersehen ist, hybridisierte die 27 S und 17 S Virus-RNS in etwa gleicher Rate wie Ribosomen-RNS mit Zell-DNS. Durch Zugabe eines Überschusses an kalter

TABELLE VI

Hybridisierung von ^{32}P-markierter Ribosomen-RNS mit Wirtszell-DNS

^{32}P-Ribosomen-RNS[a] 6000 IpM	50 ug DNS aus: infizierten Zellen		uninfizierten Zellen	
Ohne Zugabe von kalter RNS	72,0[b]	100%	81,0	100 %
Mit Zugabe von 50 ug kalter Ribosomen-RNS	11,6	16%	7,0	8.6%

[a] Die spezifische Aktivität der Ribosomen-RNS war 6 x 10^5 IpM/ug, d.h. es wurden etwa 0,01 ug RNS eingesetzt.

[b] Impulse pro Minute an hybridisierter RNS. Angegeben ist der Durchschnittswert von 2 Experimenten.

TABELLE VII

Hybridisierung der 27 und 17 S Virus-RNS mit Wirtszell-DNS[a]

DNS (100 ug)	Kompetitierende RNS	IpM	Hybridisierungsrate
Aus infizierten Zellen	-	71,8	100 %
	50 ug r-RNS	25,4	35,4%
	50 ug r-RNS + 10 ug 60 S Virus-RNS[b]	18,8	26,2%
	10 ug r-RNS + 10 ug 60 S Virus-RNS + 20 ug 4-5 S Virus-RNS[c]	17,6	24,3%

[a] In jedem Ansatz wurden 5000 IpM an gereinigter 27 + 17 S RNS aus MAV-B eingesetzt.

[b,c] Die kalte 60 S und 4 - 5 S RNS wurden aus AMV extrahiert.

Ribosomen-RNS wurde diese Hybridisierung signifikant, wenn auch nicht vollständig kompetitiert. Letzteres dürfte dadurch zu erklären sein, daß die Zugabe von 50 ug Ribosomen-RNS zwar einerseits die Hybridisierung der Virus-RNS kompetitiert, andererseits aber auch deren Hybridisierungsrate steigert. Nach einem kürzlichen Bericht von Bishop (16) wird nämlich unterhalb des RNS-Sättigungsbereiches die Hybridisierungsrate mit steigender RNS-Konzentration im Reaktionsgemisch erhöht; Vorversuche hatten gezeigt, daß in unseren Experimenten die Sättigungskonzentration von 0,025 - 0,03 ug RNS bei weitem nicht erreicht wurde.

Der Befund, daß 60 S RNS aus dem Virus eine zusätzliche Kompetition der Hybridisierung bewirkt, könnte darauf beruhen, daß die niedermolekulare Virus-RNS auch eine gewisse Menge an Degradationsprodukten der 60 S RNS enthält, die ihrerseits, wie von drei Arbeitsgruppen gezeigt wurde, in der Lage ist, zu einem gewissen Teil mit zellulärer DNS zu hybridisieren (47,70,90,93).

H) Untersuchungen über die mögliche Existenz eines zur 60 S RNS komplementären Minusstranges

In Zellen, die mit dem Paramyxovirus NDV infiziert waren, hat man zur hochmolekularen Virus-RNS komplementäre RNS-Moleküle (Minusstränge) gefunden, deren Molekulargewicht sehr viel kleiner war, als das der im Virus enthaltenen RNS(66)Sollte die Replikation der HLS-Virus-RNS wie bei anderen RNS-haltigen Viren über die Zwischenstufe einer Synthese von RNS-Minusssträngen gehen, die eventuell ebenfalls ein kleineres Molekulargewicht als die 60 S RNS

hätten, so wäre es durchaus möglich, daß solche RNS auch in das Virus eingebaut würde. Wir untersuchten durch Hybridisierungsexperimente, ob derartige RNS-Stücke im 27 bzw. 17 S Bereich vorhanden sind.

Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen RNS-Fraktionen von ^{32}P-markiertem Virus mit jeweils konstanten Mengen an kalter 60 S AMV-RNS gemischt und hybridisiert. Das Ergebnis eines solchen Versuches ist in Tabelle VIII dargestellt und zeigt, daß keine signifikante Hybridbildung zwischen 60 S RNS und niedermolekularer Virus- oder Zell-RNS stattfindet (Exp. Ia,b; IIa). Ebenso wenig wurde beobachtet, daß die 4 - 5 S RNS aus dem Virus bzw. r-RNS aus der Zelle mit sich selbst hybridisiert (Exp. Ic; IIb). In weiteren Experimenten zeigte sich allerdings eine gewisse Selbsthybridisierung der 60 S Virus-RNS. Dies dürfte dadurch zu erklären sein, daß kurze komplementäre Sequenzen in der 60 S RNS enthalten sind, an denen die von Duesberg beschriebenen 35 S Moleküle (33) durch Wasserstoffbrückenbildung vereinigt sind. Der Befund, daß man in einem Gemisch von 60 S und 27 und 17 S RNS ohne Hybridisierung eine höhere RNase-Resistenz findet als nach Hybridisierung (Exp. Ia), kann nicht erklärt werden. Der gleiche Effekt wurde beobachtet, wenn man 60 S RNS mit 4 - 5 S RNS vermischte (Exp. IIa).

TABELLE VIII

RNS-RNS-Hybridisierung

Exp.	RNS	Hybridisierung	RNase-resistente Radioaktivität in IpM	% RNase-resistente Radioaktivität
a	1 ug kalte 60 S RNS + ^{32}P 5800 IpM 27 + 17 S RNS aus MAV-B	+	295	5,4
		-	580	10,0
I_b	1 ug 60 S RNS + ^{32}P 58 000 IpM Ribosomen-RNS	+	2455	4,0
		-	4660	8,1
c	^{32}P 58 000 IpM Ribosomen-RNS	+	2300	4,0
		-	2818	4,8
a	1 ug kalte 60 S RNS + ^{32}P 5100 IpM 4 - 5 S RNS aus MAV-B	+	210	4,0
II		-	462	9,0
b	^{32}P 4000 IpM 4 - 5 S RNS aus MAV-B	+	120	3,0
		-	313	7,0

Die in Spalte "RNS angegebenen Ribonucleinsäuren wurden in jeweils doppeltem Ansatz gemischt, von denen einer ohne (- in Spalte "Hybridisierung") und der andere nach Hybridisierung (+ in Spalte "Hybridisierung") mit RNase behandelt wurde.

V. DISKUSSION

Wie alle übrigen RNS-Tumorviren enthalten auch Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren eine ungewöhnlich hochmolekulare RNS mit einer Sedimentationskonstanten von 60 - 70 S (17, 22,63-65). Sie stellt den Hauptanteil der im Virus vorhandenen RNS dar und wird im allgemeinen als das eigentliche Virusgenom angesehen, obwohl ihre Infektiosität bisher nicht bewiesen werden konnte. Praktisch alle Autoren, die diese RNS isolierten, fanden daneben verhältnismäßig große Mengen an niedermolekularer RNS von 4 - 5 S. Während diese von einigen Autoren als Degradationsprodukte der 60 S RNS angesehen wurden, konnten andere zeigen, daß es sich hierbei vorwiegend um zelluläre RNS handelt, und zwar, wie in der Folge gezeigt wurde, um Transfer-RNS (7,22,24,80).

Bauer beschrieb darüberhinaus zwei weitere RNS-haltige Komponenten, die im Bereich von 45 bzw. 30 S sedimentierten, und die durch einfache SDS-Behandlung aus dem Virus isoliert wurden (7). Diese Komponenten stellten aufgrund ihrer UV-Absorption und ihrer Markierbarkeit mit radioaktiven Aminosäuren keine reine RNS dar, sondern entsprachen den 27 und 17 S RNS-Komponenten, die wenig später von Bonar et al. nach Phenol-SDS-Extraktion von AMV isoliert worden waren (22). Bolognesi zeigte, daß man nach Phenol-Extraktion der 45 und 30 S Komponenten 27 und 17 S RNS erhielt (19a).

Diese 27 und 17 S RNS wurden von anderen Autoren entweder aufgrund eines ungenügenden Trennverfahrens nicht entdeckt oder aber für nicht signifikant gehalten bzw. auf eine Verunreinigung des Virusmaterials mit Zelldetritus zurück-

geführt (4,58,63-65). Alle Autoren, die AMV untersuchten, fanden entsprechende RNS-Komponenten im Virus, obwohl sie unterschiedliche Verfahren zur Virus-Reinigung verwendeten. Selbst in einigen Darstellungen der Publikation von Bader und Steck kann man RNS-Komponenten erkennen, die der niedermolekularen Virus-RNS in ihrem Sedimentationsverhalten entsprechen (4). Lediglich in den beiden bereits erwähnten Publikationen von Bauer (7) bzw. Bonar et al. (22) aber wurde diesen Komponenten besondere Aufmerksamkeit gewidmet und bereits gute Hinweise für deren zellulären Ursprung erbracht.

In vorliegender Arbeit wurde zunächst versucht, die widersprüchlichen Aussagen der einzelnen Arbeitsgruppen über die 27 und 17 S RNS-Komponenten zu klären, und sodann deren Eigenschaften und Charakteristika näher zu untersuchen.

Hierzu wurden zwei Viren verwendet, die aus verschiedenen Wirtszellen stammen und einen recht unterschiedlichen Gehalt an Zellmaterial aufweisen. Je nach Fragestellung wurden beide Viren im parallelen Ansatz oder nur eines von beiden verwendet. Das AMV, das aus dem Plasma von an Myeloblastose erkrankten Küken stammte, wurde in derart großen Mengen gewonnen, daß die aus diesem Virus isolierte RNS mittels UV-Absorption bestimmt werden konnte. Das in Gewebekulturen von Hühnerembryonalzellen vermehrte MAV-B erreichte zwar nur 1/1000 bis 1/10 000 der Konzentration von Plasma-AMV, war aber für radioaktive Markierungsversuche recht gut geeignet. Die hauptsächlich mit ^{32}P-Orthophosphat durchgeführte Markierung durch Inkubation der Zellen mit 100 uC/ml des Isotops ergab einen genügend hohen Einbau in die Virus-

RNS, um auch die relativ geringen Mengen an niedermolekularer RNS nachweisen zu können. Bei diesen Versuchen wurden mehr als 90 % der ins Nährmedium gegebenen Radioaktivität von den Zellen aufgenommen, wovon etwa 0,1 % in das Virus eingebaut wurden. Etwa 20 % der gesamten im Virus enthaltenen Radioaktivität entfiel auf die RNS, während die restliche Radioaktivität wahrscheinlich überwiegend in Lipoproteinen bzw. als freies Phosphat vorlag. Bei Verwendung von etwa 20 Gewebekulturschalen mit einer jeweiligen Zellkonzentration von 5×10^6/Platte erhielt man unter diesen Bedingungen $3 - 5 \times 10^6$ Imp./Min. in der Virus-RNS. Die spezifische Radioaktivität der Ribosomen-RNS erreichte unter diesen Bedingungen $3 - 4 \times 10^5$ Imp./Min./ug.

Die Untersuchung von AMV und MAV-B zeigte, daß HLS-Viren unabhängig von der Wirtszelle, in der sie vermehrt wurden, zwei RNS-Komponenten enthalten, die sich in ihrem Sedimentationsverhalten von Ribosomen-RNS nicht unterscheiden lassen und mit 27 bzw. 17 S sedimentieren. Daneben fand sich in einigen Versuchen eine weitere, mit etwa 9 S sedimentierende RNS-Fraktion.

Zur Prüfung, ob diese RNS-Komponenten integrierte Bestandteile des Virus darstellen oder auf eine Kontamination mit Zelltrümmern zurückgehen, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Um festzustellen, ob Zelltrümmer von gleicher Größe wie das Virus im Zellkulturmedium enthalten sind, wurden nichtinfizierte Kontrollzellen radioaktiv markiert und das Nährmedium unter den gleichen Bedingungen wie Virus

aufgearbeitet. Nach Saccharose-Gradienten-Zentrifugation wurde der der Virusbande entsprechende Bereich isoliert und mit Phenol extrahiert. Die Analyse des Alkohol-fällbaren Materials im Zuckergradienten ergab weder 27 noch 17 S RNS.

2. Die Möglichkeit, daß lediglich virusinfizierte Zellen Ribosomen-RNS-haltige Bruchstücke ins Nährmedium abgeben, wurde durch folgende Versuche ausgeschlossen: Nach Reinigung des Virus im Saccharose-Gradienten findet man dieses außer in der mittleren Virusbande (mittlere Bande, Abb. 2,3) auch in einer unteren Bande, die ansonsten hauptsächlich aus Zelltrümmern besteht. Die RNS-Extraktion aus beiden Banden ergab ein gleiches Verhältnis von 60 S zu 27 und 17 S RNS. Wenn im Zelldetritus Ribosomen-RNS enthalten wäre, sollte man aber erwarten, daß man aus der unteren Bande relativ mehr 27 und 17 S RNS isolieren könnte. Die in der oberen Bande enthaltene Radioaktivität geht nach Dialyse verloren. Dies deutet daraufhin, daß sie im wesentlichen freies ^{32}P-Orthophosphat und keine größeren Moleküle wie etwa Ribosomen-RNS enthält.

   In diesem Zusammenhang sei ein Versuch von Bolognesi (19a) erwähnt, der ein Gemisch von kaltem AMV und ^{3}H-Uridin markiertem Myeloblastenhomogenat der üblichen Virusreinigungsprozedur unterzog, anschließend mit RNase behandelte und dann die RNS extrahierte und analysierte. Es fand sich hiernach keinerlei radio-

aktiv markierte zelluläre RNS in den entsprechenden Sedimentationsbereichen, wohl aber die übliche Menge an kalter 27 und 17 RNS, die aus dem Virus stammten.

3. Die Annahme, daß die 27 und 17 S RNS aus Ribosomen-Untereinheiten herrührt, die an die Virusoberfläche angelagert sind, wurde dadurch geprüft, daß das Virus vor Phenol-Extraktion intensiv mit RNase behandelt wurde. Die Ribosomen-RNS sollte hierdurch verdaut werden. Ein Vergleich des RNS-Pofils aus so behandeltem Virus mit dem von unbehandeltem Kontrollvirus ergab keinen Unterschied im Gehalt an 27 und 17 S RNS.

4. Schließlich konnte geklärt werden, warum unter bestimmten Versuchsbedingungen die 27 und 17 S RNS von anderen Autoren in den Viruskonzentraten nicht entdeckt wurden. Sie weisen nach radioaktiver Markierung im allgemeinen im Vergleich zur 60 S RNS eine niedrigere spezifische Aktivität auf. Dies ist vermutlich auf ihre langsamere Syntheserate zurückzuführen (44,60). Wenn man daher, wie Bader und Steck, das Virus sehr früh nach Isotopenzugabe erntet (4), ist wohl die 60 S RNS, nicht aber die 27 und 17 S RNS radioaktiv markiert. Wenn man aber derartiges Virus so hoch konzentriert, daß die RNS mittels UV-Absorption gemessen werden kann, dann stellt man fest, daß das Mengenverhältnis von 60 S zu 27 und 17 S RNS ähnlich ist wie im Virus, das sehr viel später geerntet wird (Tabelle IV).

Aufgrund all dieser Versuche wird gefolgert, daß die 27 und 17 S RNS in das Virion integriert sind, und nicht, wie manche Autoren behaupten, aus einer Verunreinigung mit Zelldetritus herrühren. Um Näheres über die mögliche Funktion dieser RNS zu erfahren, wurden in weiteren Experimenten verschiedene ihrer Eigenschaften untersucht.

Es war bereits aufgrund des Sedimentationsverhaltens der 27 und 17 S RNS vermutet worden, daß es sich hierbei um Ribosomen-RNS handelt. Durch folgende Versuche konnte diese Annahme bestätigt bzw. bewiesen werden:

1. Genauere Untersuchungen über das Sedimentationsverhalten der 27 und 17 S RNS des Virus und der zellulären Ribosomen-RNS ergaben keinerlei Unterschiede.

2. Die Analyse der Basenzusammensetzung ergab eine weitgehende Übereinstimmung für die 27 und 17 S Virus-RNS mit den entsprechenden Ribosomen-Ribonucleinsäuren der Zelle. Vor allem der im Unterschied zur 60 S RNS sehr hohe CG-Gehalt weist daraufhin, daß die 27 und 17 S RNS aus dem Virus nur geringfügig mit Degradationsprodukten der 60 S RNS kontaminiert sind. Ebenso wie bei der aus der Zelle isolierten Ribosomen-RNS war der CG-Gehalt der 27 S RNS wesentlich höher als der der 17 S RNS.

3. In RNS-DNS-Hybridisierungsexperimenten wurde gezeigt, daß die 27 und 17 S Virus-RNS mit zellulärer DNS nicht nur in gleichem Maße hybridisierte wie Ribosomen-RNS, sondern daß diese Hybridisierung auch durch einen Überschuß an zellulärer Ribosomen-RNS kompetitiert wird. Obwohl für diese Versuche nicht mehr als 5000 IpM

Virus-RNS eingesetzt werden konnte, sind die im Hybrid nachweisbaren 70 - 80 IpM, wie entsprechende Kontrollversuche mit Ribosomen-RNS zeigten, doch als signifikant anzusehen. Die Tatsache, daß die Kompetition nicht vollständig ist, steht im Einklang mit den Ergebnissen über die Basenzusammensetzung, wonach bereits zu vermuten war, daß die 27 und 17 S RNS-Fraktionen keine reine Ribosomen-RNS darstellen, sondern darüberhinaus Degradationsprodukte der 60 S RNS enthalten. Hierfür spricht auch, daß man durch Zugabe von 60 S RNS zusätzlich zur Ribosomen-RNS im Kompetitionsexperiment den Effekt steigern kann.

Durch die vorher beschriebenen Untersuchungen über die Basenzusammensetzung und die Hybridisierbarkeit der niedermolekularen Virus-RNS mit Zell-DNS wurde noch nicht ausgeschlossen, daß in diesem Bereich auch zur Virus-RNS komplementäre Minusstrang-RNS enthalten ist. Um diese Frage zu untersuchen, wurde geprüft, ob sich die niedermolekulare RNS mit der 60 S RNS hybridisieren läßt. Die entsprechenden Versuche fielen negativ aus und gaben keinerlei Hinweis auf das Vorhandensein einer Virus-Minusstrang-RNS. Der gewisse Grad an Selbsthybridisierbarkeit von 60 S RNS könnte durch die Duesberg'schen Experimente erklärt werden (33). Hiernach besteht die 60 S RNS, wie bereits erwähnt, aus 4 oder 5 Untereinheiten, die an ihrem Ende aufgrund einer Basenkomplementarität durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Solche kurzen Stücke sollten miteinander hybridisieren.

Schließlich ergaben stöchiometrische Berechnungen, daß pro Virusteilchen im Durchschnitt je 1 Molekül 27 S bzw. 17 S RNS vorhanden sind.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß HLS-Viren neben der hochmolekularen 60 S und der 4 - 5 S Transfer-RNS noch zwei RNS-Komponenten enthalten, die vorwiegend Ribosomen-RNS darstellen, sowie eine kleinere RNS-Fraktion von etwa 9 S. Nach verschiedenartigen Kontrollexperimenten sind sie nicht etwa zufällig an die Virushülle adsorbiert, sondern stellen einen integrierten Bestandteil des Virion dar, möglicherweise in Form von Ribosomen-Untereinheiten. Hierfür spricht der Befund, daß diese RNS-Komponenten nach einfacher SDS-Behandlung des Virus in einem Protein-RNS-Komplex mit etwa 45 bzw. 30 S sedimentieren (7). Dieser Befund ist nicht erstaunlich, wenn man bedenkt, daß z.B. das Polyoma-Virus, das von seiner Struktur her in eine ganz andere Virusgruppe gehört und einen ziemlich reinen Protein-Nucleinsäure-Komplex darstellt, erhebliche Mengen an zellulärer DNS enthalten kann (55,92).

Bei den derzeitigen Kenntnissen über den Vermehrungsmechanismus der HLS-Viren können über eine mögliche Funktion der im Virus enthaltenen Ribosomen-RNS nur Vermutungen angestellt werden. Es ist auffallend, daß nach den Ergebnissen von Immunfluoreszenzuntersuchungen die Konzentration von virusspezifischen Strukturantigenen in der Zelle im Vergleich zu anderen Virussystemen sehr niedrig liegt. Auch die Konzentration von virusspezifischer hochmolekularer RNS liegt an der Grenze der Nachweisbarkeit. Da der Zusammenbau

des Virus erst unmittelbar beim Durchtritt durch die Zellmembran stattfindet, ist es denkbar, daß auch die Synthese der Virusuntereinheiten kurz vor diesem Prozeß und in nächster Nähe der Ausschleusungsstelle stattfindet. Dies hätte zur Folge, daß, zufällig oder nicht, Teile des Proteinsynthese-Apparates mit in das Virus eingebaut werden, und zwar neben Ribosomen-Untereinheiten auch Transfer-RNS, und möglicherweise sogar Messenger-RNS, die mit der aus dem Virus isolierten 9 S RNS unter Umständen identisch ist. Für die Transfer-RNS ist gezeigt worden, daß sie gewisse spezifische Unterschiede zur üblichen zellulären Transfer-RNS aufweist. Ob ähnliches auch für die Ribosomen-RNS zutrifft, kann zur Zeit nicht entschieden werden. In diesem Zusammenhang sind aber die kürzlich von Altaner und Temin publizierten Ergebnisse von Interesse.[1a] Diese Autoren fanden, daß sich der B77 Hühner-Sarkom-Virusstamm nach einmaliger Passage in Rattenzellen für ein bis zwei nachfolgende Passagen in Rattenzellen besser vermehrte als nach Passage in Hühnerzellen. Möglicherweise benötigt das Virus für eine optimale Vermehrung eine gewisse Menge an rein zellspezifischen oder auch virusmodifizierten Zell-RNS-Molekülen, die für die Proteinsynthese notwendig sind.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren kann neben der hochmolekularen Virus-RNS und Transfer-RNS auch Ribosomen-RNS isoliert werden. Diese stellt einen integrierten Bestandteil des Virus dar. Der Gehalt an Ribosomen-RNS ist unabhängig von Virusstamm und Wirtszelle. Pro Virusteilchen sind im Durchschnitt je 1 Molekül 27 und 17 S RNS vorhanden. Ihre mögliche Funktion wird diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Armstrong, D.

Multiple group specific antigen components of avian tumor viruses detected with chicken and hamster sera.

J.Virology 3, 133-139 (1969)

1a. Altaner, G. and Temin, H.M.

Carcinogenesis by RNA sarcoma viruses. XII. A quantitative study of infection of rat cells in vitro by avian sarcoma viruses.

Virology 40, 118-134 (1970)

2. Bader, J.P.

Metabolic requirements for infection by Rous sarcoma virus. I. The transient requirement for DNA synthesis.

Virology 29, 444-451 (1966a)

3. Bader, J.P.

Metabolic requirements for infection by Rous sarcoma virus. II. The participation of cellular DNA.

Virology 29, 452-461 (1966b)

4. Bader, J.P. and Steck, T.L.

Analysis of the ribonucleic acid of murine leukemia virus.

J.Virology 4, 454-459 (1969)

5. Bauer, H. und Schäfer, W.

Isolierung eines gruppenspezifischen Antigens aus dem Hühner-Myeloblastose-Virus (BAI Stamm A).

Z.Naturforsch. 20b, 815-817 (1965)

6. Bauer, H., Bahnemann, H. und Schäfer, W.

Untersuchungen über das Myeloblastose-Virus des Huhnes (BAI Stamm A). I. Nachweis und Vermehrungskinetik des Virus in Hühnerfibroblasten-Kulturen.

Z.Naturforsch. 20b, 959-965 (1965)

7. Bauer, H.

Untersuchungen über das Myeloblastose-Virus des Huhnes (BAI Stamm A). II. Isolierung und Charakterisierung der im Virus enthaltenen Nucleinsäure.

Z.Naturforsch. 21b, 453-460 (1966)

8. Bauer, H. and Schäfer, W.

Origin of group-specific antigen of chicken leukosis viruses.

Virology 29, 494-496 (1966)

9. Bauer, H. and Schäfer, W.

Studies on physical, chemical and antigenic properties of a chicken leukosis virus.

in 'Subviral Carcinogenesis'
1st Intern. Symposium on tumor viruses, Nagoya, Japan
ed.: Y. Ito, Nagoya, Japan, 1967, S. 337-352

10. Bauer, H. and Graf, T.

Evidence for the possible existence of two envelope antigenic determinants and corresponding cell receptors for avian tumor viruses.

Virology 37, 157-161 (1969)

11. Bauer, H., Tozawa, H., Gelderblom, H., Bolognesi, D.P. and Graf, T.

Structure and specific antigens of avian leukosis viruses.

The 4th Intern. Symposium on comparative leukemia research, Cherry Hill, New Jersey, USA, 1969
S. Karger Verlag, Basel

12. Bauer, H.

Untersuchungen über Struktur, Vermehrung und onkogene Wirkung der Hühner-Leukose-Sarkomatose-Viren.

Zbl.Vet.Med., Reihe B 17, 582-630 (1970)

13. Beard, J.W.

Avian virus growth and their etiologic agents.

Adv.Cancer Res. 7, 1-127 (1963)

14. Beard, J.W., Bonar, R.A., Heine, U., de Thé, G. and Beard, D.

Studies on the biological, biochemical and biophysical properties of avian tumor viruses.

in 'Viruses, nucleic acids and cancer'
Williams and Wilkins, Baltimore, 1963, p. 344-373

15. Bernhard, W.

The detection and study of tumor viruses with the electron-microscope.

Cancer Res. 20, 712-727 (1960)

16. Bishop, T.O.

Interpretation of DNA-RNA hybridization data.

Nature 224, 600-603 (1969)

17. Biswal, N. and Benyesh-Melnick, M.

Complementary nuclear RNA's of murine sarcoma-leukemia-virus komplex in transformed cells.

Proc.Natl.Acad.Sci. 64, 1372-1379 (1969)

18. Blobel, G. and Potter, O.R.

Studies on the free and membrane-bound ribosomes in rat lines. I. Distribution as related to total cellular RNA.

J.Mol.Biol. 26, 279-292 (1967)

19. Bolognesi, D.P. and Obara, T.

Minor RNA and other components of host origin intrinsic to avian leukosis virus particles.

The 4th Intern.Symposium on comparative leukemia research, Cherry Hill, New Jersey, USA, 1969
S. Karger Verlag, Basel

19a. Bolognesi, D.P.

Ribosomal transfer-ribonucleic acids intrinsic to the BAI strain A avian tumor (myeloblastosis) viruses.

Dissertation, Duke University, Durham, North Carolina 1967

20. Bonar, R.A. and Beard, J.W.

Virus of avian myeloblastosis. II. Chemical constitution.

J.Natl.Cancer Inst. 23, 183-197 (1959)

21. Bonar, R.A. Heine, U., Beard, D. and Beard, J.W.

Virus of avian myeloblastosis (BAI strain A). XXII. Morphology of the virus and comparison with strain R (Erythroblastosis).

J.Natl.Cancer Inst. 30, 949-997 (1963)

22. Bonar, R.A., Sverak, L., Bolognesi, D.P., Langlois, A.J., Beard, D. and Beard, J.W.

Ribonucleic acid components of BAI strain A (Myeloblastosis) avian tumor virus.

Cancer Res. 27, 1138-1157 (1967)

23. The 4th Intern. Symposium on comparative leukemia research, Cherry Hill, New Jersey, USA, 1969
S. Karger Verlag, Basel

24. Carnegie, J.W., Denney, A.O.C., Olson, K.L. and Beaudreau,

An RNA fraction from myeloblastosis virus having properties similar to transfer RNA.

Biochim. Biophys. Acta 190, 274-284 (1969)

25. Crawford, L.V.

Study of Rous sarcoma virus by density gradient centrifugation.

Virology 12, 143-153 (1960)

26. Crawford, L.V. and Crawford, E.M.

The properties of Rous sarcoma virus purified by density gradient centrifugation.

Virology 13, 227-232 (1961)

27. Crittenden, L.B., Okazaki, W. and Reamer, R.H.

Genetic resistance to Rous sarcoma virus in embryo cell cultures and embryo.

Virology 20, 541-544 (1963)

28. Crittenden, L.B.

Observation on the nature of a genetic cellular resistance to avian tumor viruses.

J. Natl. Cancer Inst. 41, 145-153 (1968)

29. de Thé, G.

Localization and origin of the adenosinetriphosphatase activity of nephroblastoma cells and virus.

Natl. Cancer Inst. Monograph 17, 651-661 (1964)

30. Dounce, A.L., Witter, R.F., Monty, K.J., Pate, S. and Cotton, M.A.

A method for isolating intact mitochondria and nuclei from the same homogenate, and the influence of mitochondrial destruction on the properties on cell nuclei.

J. Biophys. Biochem. Cytology 1, 139-153 (1955)

31. Duesberg, P.H., Robinson, H.L., Robinson, W.S., Huebner, R.J. and Turner, H.C.
Proteins of Rous sarcoma virus.
Virology 36, 73-86 (1968)

32. Duesberg, P.H. and Robinson, W.S.
Nucleic acid and proteins isolated from the Rauscher mouse leukemia virus (MLV).
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 55, 219-227 (1966)

33. Duesberg, P.H.
Physical properties of Rous sarcoma virus RNA.
Proc.Natl.Acad.Sci. 60, 1511-1518 (1968)

34. Duff, R.G. and Vogt, P.K.
Characteristics of two new avian tumor virus subgroups.
Virology 39, 18-30 (1969)

35. Dulbecco, R.
Production of plaques in a monolayer tissue culture by single particles of an animal virus.
Proc.Natl.Acad.Sci. 38, 747-752 (1952)

36. Eagle, H.
Propagation in fluid medium of human epidermoid carcinoma strain KB.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 89, 362-364 (1955)

37. Eckert, E.A., Rott, R. and Schäfer, W.
Myxovirus-like structure of avian myeloblastosis virus.
Z.Naturforsch. 18b, 339-340 (1963)

38. Ellerman, V. und Bang, O.
Experimentelle Leukämie bei Hühnern.
Zbl.Bakt., Abt. I 46, 595-606 (1908)

39. Erikson, R.L.
Studies on the RNA from avian myeloblastosis virus.
Virology 37, 124-131 (1969)

40. Gelderblom, H., Bauer, H. and Frank, H.
Investigations on virus production in RSV mammalian tumors.
J.gen.Virology 7, 33-45 (1970)

41. Giebler, P.
Definierung und Auswertung präparativer Ultrazentrifugierungen mit Hilfe des "Performance Index (pi)".
Z.Naturforsch. 13b, 238-241 (1958)

42. Gierer, A. and Schramm, G.
Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus.
Nature 177, 702-703 (1956)

43. Gillespie, D. and Spiegelman, S.
A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane.
J.Mol.Biol. 12, 829-842 (1965)

44. Girard, M., Penman, S. and Darnell, J.E.
The effect of Actinomycin D on ribosome formation in HeLa cells.
Proc.Natl.Acad.Sci. 51, 205-211 (1964)

45. Gross, L.
"Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation, in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK embryos.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 76, 27-32 (1951)

46. Hanafusa, H.
Analysis of the defectiveness of Rous sarcoma virus. III. Determining influence of new helper virus on the host range of susceptibility to interference of RSV.
Virology 25, 248-255 (1965)

47. Harel, L., Harel, J., Lacour, F. and Huppert, J.
Homologie entre génome du virus de la myéloblastose aviaire (AMV) et génome cellulaire.
CR.Acad.Sci. (Paris) 263, 616-619 (1966)

48. Heine, U., de Thé, G., Ishiguro, H., Sommer, J.R., Beard, D. and Beard, J.W.

Multiplicity of cell response to BAI strain A (Myeloblastosis) II. Nephroblastoma (Wilm's tumor): Ultrastructure.

J.Natl.Cancer Inst. 29, 41-106 (1962)

49. Hofschneider, P.H. and Hausen, P.

The replication cycle.

in 'Molecular basis of virology'
ed.: Fraenkel-Conrat, F., Reinhold book corporation, New York, Amsterdam, London, p. 169-208, 1968

50. Huppert, J., Lacour, F., Harel, J. and Harel, L.

High molecular weight RNA from avian myeloblastosis virus.

Cancer Res. 26, 1561-1568 (1966)

51. Jarrett, W.F.H., Crawford, E.M., Martin, W.B. and Davis, F.

A virus-like particle associated with leukemia (Lymphosarcoma).

Nature 202, 567-568 (1964)

52. Loening, U.E.

The fractionation of high molecular weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel-electrophoresis.

Biochem.J. 102, 251-257 (1967)

53. Manakar, R.A. and Groupé, V.

Discrete foci of altered chicken embryo cells associated with Rous sarcoma virus in tissue culture.

Virology 2, 838-840 (1956)

54. Marmur, J.

A procedure for isolation of desoxyribonucleic acid from micro-organisms.

J.Mol.Biol. 3, 208-218 (1961)

55. Mischel, M.R., Hirt, B. and Weil, R.

Mouse cellular DNA enclosed in polyoma virus capsids (pseudo virions).

Proc.Natl.Acad.Sci. 58, 1381-1388 (1967)

56. Montagnier, L. and Bellamy, A.

18-S and 30-S fractions from the RNA of Krebs-2 ascites cells with differing base composition.

Biochim. Biophys. Acta 80, 157-160 (1964)

57. Moscovici, E. and Vogt, P.K.

Effects of genetic cellular resistance on cell transformation and virus replication in chicken hematopoietic cell cultures infected with avian myeloblastosis virus (BAI-A).

Virology 35, 487-497 (1968)

58. Olson, K.C., Denney, A.O.C. and Beaudreau, G.S.

Inhibition of protein synthesis by an RNA fraction from myeloblastosis virus.

Biochim. Biophys. Acta 161, 532-547 (1968)

59. Peacock, A.C. and Digman, C.W.

Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide-gel-electrophoresis.

Biochemistry 6, 1818-1827 (1967)

60. Perry, R.P.

On ribosome biogenesis.

Natl. Cancer Inst. Monograph. 23, 527-545 (1966)

61. Payne, F.E., Solomon, J.J. and Purchase, H.G.

Immunofluorescent studies of group specific antigen of the avian sarcoma leukosis virus.

Proc. Natl. Acad. Sci. 55, 341-348 (1966)

62. Piraino, F.

The mechanism of genetic resistance of chick embryo cells to infection by Rous sarcoma virus Bryan strain (BR-RSV).

Virology 32, 700-707 (1967)

63. Robinson, W.S. and Baluda, M.A.

The nucleic acid from avian myeloblastosis virus compared with the RNA from Bryan strain of Rous sarcoma virus.

Proc. Natl. Acad. Sci. 54, 1686-1692 (1965)

64. Robinson, W.S., Pitkanen, A. and Rubin, H.

The nucleic acid of the Bryan strain of Rous sarcoma virus. Purification of the virus and isolation of the nucleic acid.

Proc.Natl.Acad.Sci. 54, 137-144 (1965)

65. Robinson, W.S. and Duesberg, P.H.

Tumor virus RNA.

in 'Subviral carcinogenesis'
1st Intern.Symposium on tumor viruses, Nagoya, Japan
ed.: Y. Ito, Nagoya, Japan, 1967, S. 3-18

66. Robinson, W.S.

Self-annealing of subgroup 2 myxovirus RNAs.

Nature 225, 944-945 (1970)

67. Rosenbergova, M., Lacour, F. and Huppert, J.

Mise en évidence d'une activité nucléasique associée au virus de la myéloblastose aviaire lors de tentatives de purification de ce virus et de son acide ribonucléique.

CR.Acad.Sci. (Paris) 260, 5145-5148 (1965)

68. Roth, F.K. and Dougherty, R.M.

Multiple antigenic components of the group specific antigen of the avian leukosis sarcoma viruses.

Virology 38, 278-284 (1969)

69. Rous, P.

A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells.

J.Exptl.Med. 13, 397-411 (1911)

70. Rukusăinová, T.

Use of the nucleic acid hybridization of DNA homologous to Rous virus RNA in RSV transformed mammalian cells.

Folia Biologica 15, 96-103 (1969)

71. Sebring, E.D. and Salzman, N.P.

An improved procedure for measuring the distribution of $P^{32}O_4$ among the nucleotides of ribonucleic acid.

Anal.Biochem. 8, 126-129 (1964)

71.a. Spirin, A.S.

Some problems concerning the macromolecular structure of ribonucleic acids.

in 'Progress in nucleic acid research'
ed.: J.N. Davidson and W.E. Cohn, Academic Press, 1963,
S. 301-345

72. Sharp, D.G. and Beard, J.W.
Virus of avian erythroblastic leukosis. IV. Sedimentation, density and hydration.
Biochim.Biophys.Acta 14, 12-17 (1954)

73. Steck, F.T. and Rubin, H.
The mechanism of interference between avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. I. Establishment of interference.
Virology 29, 628-641 (1966)

74. Steck, F.T. and Rubin, H.
The mechanism of interference between avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. II. Early steps of infection by RSV of cells under conditions of interference.
Virology 29, 642-653 (1966)

75. Temin, H. and Rubin, H.
Characteristic of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture.
Virology 8, 669-688 (1958)

76. Temin, H.M. and Rubin, H.
A kinetic study of infection of chick embryo cell in vitro by Rous sarcoma virus.
Virology 6, 209-222 (1959)

77. Temin, H.M.
The participation of DNA in Rous sarcoma virus production.
Virology 23, 486-494 (1964a)

78. Temin, H.M.
The nature of the provirus of Rous sarcoma.
Natl.Cancer Inst.Monograph. 17, 557-570 (1964b)

79. Tozawa, H., Bauer, H., Graf, T. and Gelderblom, H.
Strain-specific antigen of the avian leukosis sarcoma virus group. I. Isolation and immunological characterization.
Virology 40, 530-539 (1970)

80. Trávníček, M.

Some properties of amino acid acceptor RNA isolated from avian tumor virus BAI strain A (Myeloblastosis virus).

Biochim. Biophys. Acta 182, 427-439 (1969)

81. Vigier, P. and Goldé, A.

Effects of actinomycin D and of mytomycin C on the development of Rous sarcoma virus.

Virology 23, 511-519 (1964)

82. Vogt, P.K. and Rubin, H.

Studies on the assay and multiplication of avian myeloblastosis virus.

Virology 19, 92-104 (1963)

83. Vogt, P.K.

Avian tumor viruses.

in 'Advance in virus research'
ed.: K.K. Smith and M.A. Lauffer, Academic Press New York, London, Vol. 11, p. 293-385

84. Vogt, P.K.

A heterogeneity of Rous sarcoma virus revealed by selectively resistant chick embryo cells.

Virology 25, 237-247 (1965)

85. Vogt, P.K. and Ishizaki, R.

Patterns of viral interference in the avian leukosis and sarcoma complex.

Virology 30, 368-374 (1966)

86. Vogt, P.K., Ishizaki, R. and Duff, R.

Studies on the relationships among avian tumor viruses.

in 'Subviral carcinogenesis'
1st Intern. Symposium on tumor viruses, Nagoya, Japan
ed.: Y. Ito, Nagoya, Japan, 1967, p. 297-310

87. Watanabe, Y., Prevec, L. and Grahm, A.F.

Specificity in transcription of the Reovirus genome.

Proc. Natl. Acad. Sci. 58, 1040-1046 (1967)

88. Watson, K.F. and Beaudreau, G.S.
Isolation of a RNA-dependent RNA polymerase from virus infected myeloblasts.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 37, 925-932 (1969)

89. Weissman, C., Borst, P., Burdon, R.H., Billeter, M.A. and Ochoa, S.
Replication of viral RNA. III. Double-stranded replicative form of MS2 phage RNA.
Proc.Natl.Acad.Sci. 51, 682-690 (1964)

90. Wilson, D.E. and Bauer, H.
Hybridization of avian myeloblastosis virus RNA with DNA from chick embryo cells.
Virology 33, 754-757 (1967)

91. Wilson, R.G. and Bader, J.P.
Viral ribonucleic acid polymerase: Chick embryo cells infected with vesicular stomatitis virus and Rous-associated virus
Biochim.Biophys.Acta 103, 549-557 (1965)

92. Winocour, E.
Further studies on the incorporation of cell DNA into polyoma related particles.
Virology 34, 571-582 (1968)

93. Yoshikawa-Fukada, M. and Ebert, J.D.
Hybridization of RNA from Rous sarcoma virus with cellular and viral DNA's.
Proc.Natl.Acad.Sci. 64, 870-877 (1969)

Lebenslauf

Am 30. April 1939 wurde ich als zweiter Sohn des Professors Dr. Tetsujiro Obara und seiner Ehefrau Hideko in Tokyo geboren; ich habe noch vier Geschwister.

Von April 1946 bis März 1952 besuchte ich die Volksschule in Tokyo, von April 1952 bis März 1958 nacheinander die Kyoikudaigaku-Fuzoku-Komaba (Mittelschule) und die Seijo-Gakuen (Höhere Schule).

Im April 1960 immatrikulierte ich mich in der Pharmakologisch-pharmazeutischen Fakultät an der Tokyo Universität der Naturwissenschaften, wo ich im März 1964 das Pharmakologisch-pharmazeutische Studium mit einer Abschlußarbeit und bestandener Prüfung abschloß.

Noch im gleichen Monat begann ich meine Arbeit als wissenschaftlicher Assistent im Physiologischen Institut der Tokyo Jikeikai Medizinischen Hochschule.

Im Sommersemester 1965 immatrikulierte ich mich zur biochemischen Weiterbildung an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen und bestand im Februar 1968 die Diplom-Prüfung zum Biochemiker unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. G. Weitzel.

Im April 1968 begann ich meine Dissertation am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, die ich unter der wissenschaftlichen Anleitung von Professor Dr. W. Schäfer und Priv.-Doz. Dr. H. Bauer durchführte.

Diese Arbeit hat das Thema: "Untersuchung über die Nucleinsäuren von Leukämieviren".

Im Februar 1967 heiratete ich die Japanerin Kyo Endo.
Am 11. Februar 1968 wurde unser Sohn Shinya geboren.

Meine akademischen Lehrer waren:

an der Tokyo Universität der Naturwissenschaften:

Pharmakologie:	Prof. Dr. T. Kaku
Organische Chemie:	Prof. Dr. T. Sasaki Prof. Dr. A. Kanematsu
Biochemie:	Prof. Dr. H. Moriya Prof. Dr. T. Moriwaki
Mikrobiologie:	Prof. Dr. T. Tatsuno Prof. Dr. Y. Ueno
Botanische Chemie:	Prof. Dr. T. Murakami Prof. Dr. H. Itokawa
Analytische Chemie:	Prof. Dr. H. Hasegawa Prof. Dr. S. Takitani
Physikalische Chemie:	Prof. Dr. T. Kondo
Hygienische Chemie:	Prof. Dr. T. Nakai Prof. Dr. T. Ishikura

an der Universität Tübingen:

Biochemie:	Prof. Dr. Dr. G. Weitzel Prof. Dr. F. Schneider Dr. H. Guglielmi
Physikalische Biochemie:	Prof. Dr. H. Friedrich-Freksa
Pathologische Biochemie:	Prof. Dr. H. Hillmann
Genetik:	Prof. Dr. H. Friedrich-Freksa
Immunchemie:	Prof. Dr. A. Anderer
Organische Chemie:	Prof. Dr. M. Hanack Prof. Dr. G. Opitz Prof. Dr. H. Suhr Prof. Dr. H. Machleidt